ДНК-ТЕХНОЛОГИЯ

Инструкция по применению
АнеуПГТ

Организация-производитель

СОГЛАСОВАНО

Генеральный директор

ООО «ДНК-Технология ТС»

_____ С.А. Самарин

«12» декабря 2024 г.

Организация-разработчик

УТВЕРЖДАЮ

Генеральный директор

ООО «НПФ ДНК-Технология»

_____ С.П. Левичев

«12» декабря 2024 г.

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

Набор реагентов
для выявления хромосомных аномалий в единичных клетках
методом высокопроизводительного секвенирования NGS на платформе Illumina
(АнеуПГТ)

2024 г.

ЭЛЕКТРОННАЯ КОПИЯ ОФОРМЛЕНА ЦЕНТРОМ ИСПЫТАНИЙ И РЕГИСТРАЦИИ МЕДИЦИНСКИХ ИЗДЕЛИЙ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И ОБОЗНАЧЕНИЙ

В настоящей инструкции используются следующие сокращения и обозначения:

CNV	- от англ. copy number variation, отклонение числа копий
MDA	- от англ. multiple displacement amplification, амплификация со множественным замещением цепи
NGS	- от англ. next generation sequencing
SD	- от англ. standard deviation, стандартное отклонение (среднеквадратичное отклонение)
Бин	- фрагмент хромосомы фиксированной длины
ДИ	- доверительный интервал
ДНК	- дезоксирибонуклеиновая кислота
ДНКазы	- дезоксирибонуклеазы
ЛИС	- лабораторная информационная система
ПГТ-А	- преимплантационное генетическое тестирование на анеуплоидии
ПО	- программное обеспечение
ПЦР	- полимеразная цепная реакция
Рид	- от англ. read, отдельное прочтение фрагмента ДНК
РНКазы	- рибонуклеазы

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

2 ПРЕДНАЗНАЧЕННОЕ ПРИМЕНЕНИЕ

1.1 **Полное наименование набора реагентов:** Набор реагентов для выявления хромосомных аномалий в единичных клетках методом высокопроизводительного секвенирования NGS на платформе Illumina (АнеуПГТ), далее по тексту – набор реагентов.

1.2 **Назначение:** набор реагентов предназначен для проведения преимплантационного генетического тестирования на анеуплоидии (ПГТ-А) методом полногеномного высокопроизводительного секвенирования (NGS) в единичных клетках трофэктодермы.

1.3 **Функциональное назначение:** преимплатационный скрининг анеуплоидий.

1.4 **Показания к проведению исследования:** скрининг изменения числа копий аутосом и половых хромосом, а также частичных делеций и дупликаций хромосом эмбриона по анализу клеток трофэктодермы для определения хромосомного статуса плода, для профилактики невынашивания беременности и рождения детей с хромосомной патологией при принятии решения о переносе эмбриона в полость матки.

Противопоказаний к применению нет.

1.5 **Популяционные и демографические аспекты:** набор реагентов предназначен для проведения преимплатационного генетического тестирования единичных клеток трофэктодермы.

1.6 **Факторы, влияющие на результаты исследования:** триплоидия, мозаицизм менее 20%, нарушение условий хранения и транспортировки биопсий.

1.7 **Область применения:** набор реагентов может быть использован в клинико-диагностических лабораториях медицинских учреждений.

1.8 **Потенциальные пользователи:** квалифицированный персонал, обученный методам молекулярной диагностики и правилам работы в клинико-диагностической лаборатории с использованием методов высокопроизводительного секвенирования.

Результаты, полученные при использовании набора реагентов, следует рассматривать и интерпретировать врачу-генетику или врачу-репродуктологу в сочетании с данными анамнеза и других инструментальных и лабораторных исследований.

1.9 Применять набор реагентов строго по назначению согласно данной инструкции по применению.

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

3 ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ

3.1 Состав набора реагентов

Набор реагентов выпускается в 3-х вариантах исполнения: комплектация A.N.384, комплектация B.N.384 и комплектация B.N.96x4. Варианты исполнения различаются между собой наличием или отсутствием в составе набора реагентов комплекта реагентов для секвенирования и количеством образцов на один запуск секвенатора (384 или 96).

REF S5-517-AX Комплектация A.N.384				
Наименование компонентов	Внешний вид	Количество	Номинальный объём компонента	Часть
Комплект реагентов для амплификации MDA				
Реагент LYS	Прозрачная бесцветная жидкость	4 пробирки	по 100 мкл	1 из 3
Реагент NEU	Прозрачная бесцветная жидкость	4 пробирки	по 200 мкл	
Реагент MDA	Прозрачная бесцветная жидкость	4 пробирки	по 1,8 мл	
Фермент-PHI	Прозрачная бесцветная вязкая маслянистая жидкость	4 пробирки	по 100 мкл	
Комплект реагентов для подготовки полногеномных библиотек				
Реагент TRB	Прозрачная бесцветная жидкость	4 пробирки	по 1,85 мл	2 из 3
Фермент-TN5	Прозрачная бесцветная вязкая маслянистая жидкость	4 пробирки	по 150 мгл	
Фермент-TAT	Прозрачная бесцветная вязкая маслянистая жидкость	4 пробирки	по 50 мкл	
Индексы set A	Прозрачная бесцветная жидкость	1 микропланшет	96 лунок по 10 мкл	
Индексы set B	Прозрачная бесцветная жидкость	1 микропланшет	96 лунок по 10 мкл	
Индексы set C	Прозрачная бесцветная жидкость	1 микропланшет	96 лунок по 10 мкл	
Индексы set D	Прозрачная бесцветная жидкость	1 микропланшет	96 лунок по 10 мкл	
Реагент MQ	Прозрачная бесцветная жидкость	4 флакона	по 15 мл	3 из 3
Реагент ST	Прозрачная бесцветная жидкость	4 пробирки	по 1,0 мл	
Раствор МЧ Pure	Прозрачная бесцветная жидкость с осадком, образующим взвесь коричневого цвета при встряхивании	4 флакона	по 10,8 мл	
Реагент AMP	Прозрачная бесцветная жидкость	4 пробирки	по 1,5 мл	
Раствор МЧ SizeS	Прозрачная бесцветная жидкость с осадком, образующим взвесь коричневого цвета при встряхивании	4 флакона	по 10,8 мл	
Реагент TEL	Прозрачная бесцветная жидкость	4 флакона	по 5,0 мл	
Дистрибутив с программным обеспечением «СекВарио АнеуПГТ» (версия 1.0)				1 шт.

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

REF S6-517-BX Комплектация B.N.384				
Наименование компонентов	Внешний вид	Количество	Номинальный объём компонента	Часть
Комплект реагентов для амплификации MDA				
Реагент LYS	Прозрачная бесцветная жидкость	4 пробирки	по 100 мкл	1 из 7
Реагент NEU	Прозрачная бесцветная жидкость	4 пробирки	по 200 мкл	
Реагент MDA	Прозрачная бесцветная жидкость	4 пробирки	по 1,8 мл	
Фермент-PHI	Прозрачная бесцветная вязкая маслянистая жидкость	4 пробирки	по 100 мкл	
Комплект реагентов для подготовки полногеномных библиотек				
Реагент TRB	Прозрачная бесцветная жидкость	4 пробирки	по 1,85 мл	2 из 7
Фермент-TN5	Прозрачная бесцветная вязкая маслянистая жидкость	4 пробирки	по 150 мгл	
Фермент-TAT	Прозрачная бесцветная вязкая маслянистая жидкость	4 пробирки	по 50 мкл	
Индексы set A	Прозрачная бесцветная жидкость	1 микропланшет	96 лунок по 10 мкл	
Индексы set B	Прозрачная бесцветная жидкость	1 микропланшет	96 лунок по 10 мкл	
Индексы set C	Прозрачная бесцветная жидкость	1 микропланшет	96 лунок по 10 мкл	
Индексы set D	Прозрачная бесцветная жидкость	1 микропланшет	96 лунок по 10 мкл	
Реагент MQ	Прозрачная бесцветная жидкость	4 флакона	по 15 мл	3 из 7
Реагент ST	Прозрачная бесцветная жидкость	4 пробирки	по 1,0 мл	
Раствор МЧ Pure	Прозрачная бесцветная жидкость с осадком, образующим взвесь коричневого цвета при встряхивании	4 флакона	по 10,8 мл	
Реагент AMP	Прозрачная бесцветная жидкость	4 пробирки	по 1,5 мл	
Раствор МЧ SizeS	Прозрачная бесцветная жидкость с осадком, образующим взвесь коричневого цвета при встряхивании	4 флакона	по 10,8 мл	
Реагент TEL	Прозрачная бесцветная жидкость	4 флакон	по 5,0 мл	
Комплект реагентов для секвенирования[1]				
Буфер HT1		1 пробирка	12,0 мл	4 из 7
Картридж с реагентами		1 шт.	-	5 из 7
Проточная ячейка		1 шт.	-	6 из 7
Картридж с буфером		1 шт.	-	7 из 7
Дистрибутив с программным обеспечением «СекВарио АнеуПГТ» (версия 1.0)				1 шт.

[1] - NextSeq™ 500/550 High Output Kit v2.5 (75 Cycles). Кат. № 20024906. 1 набор входит в эту комплектацию

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

REF S6-517-B9 Комплектация B.N.96x4				
Наименование компонентов	Внешний вид	Количество	Номинальный объём компонента	Часть
Комплект реагентов для амплификации MDA				
Реагент LYS	Прозрачная бесцветная жидкость	4 пробирки	по 100 мкл	1 из 7
Реагент NEU	Прозрачная бесцветная жидкость	4 пробирки	по 200 мкл	
Реагент MDA	Прозрачная бесцветная жидкость	4 пробирки	по 1,8 мл	
Фермент-PHI	Прозрачная бесцветная вязкая маслянистая жидкость	4 пробирки	по 100 мкл	
Комплект реагентов для подготовки полногеномных библиотек				
Реагент TRB	Прозрачная бесцветная жидкость	4 пробирки	по 1,85 мл	2 из 7
Фермент-TN5	Прозрачная бесцветная вязкая маслянистая жидкость	4 пробирки	по 150 мгл	
Фермент-TAT	Прозрачная бесцветная вязкая маслянистая жидкость	4 пробирки	по 50 мкл	
Индексы set A	Прозрачная бесцветная жидкость	1 микропланшет	96 лунок по 10 мкл	
Индексы set B	Прозрачная бесцветная жидкость	1 микропланшет	96 лунок по 10 мкл	
Индексы set C	Прозрачная бесцветная жидкость	1 микропланшет	96 лунок по 10 мкл	
Индексы set D	Прозрачная бесцветная жидкость	1 микропланшет	96 лунок по 10 мкл	
Реагент MQ	Прозрачная бесцветная жидкость	4 флакона	по 15 мл	3 из 7
Реагент ST	Прозрачная бесцветная жидкость	4 пробирки	по 1,0 мл	
Раствор МЧ Pure	Прозрачная бесцветная жидкость с осадком, образующим взвесь коричневого цвета при встряхивании	4 флакона	по 10,8 мл	
Реагент AMP	Прозрачная бесцветная жидкость	4 пробирки	по 1,5 мл	
Раствор МЧ SizeS	Прозрачная бесцветная жидкость с осадком, образующим взвесь коричневого цвета при встряхивании	4 флакона	по 10,8 мл	
Реагент TEL	Прозрачная бесцветная жидкость	4 флакона	по 5,0 мл	
Комплект реагентов для секвенирования[1]				
Буфер HT1		4 пробирки	по 12,0 мл	4 из 7
Картридж с реагентами		4 шт.	-	5 из 7
Проточная ячейка		4 шт.	-	6 из 7
Картридж с буфером		4 шт.	-	7 из 7
Дистрибутив с программным обеспечением «СекВарио АнеуПГТ» (версия 1.0)				1 шт.

Все компоненты набора реагентов готовы к применению и не требуют дополнительной подготовки к работе.

Комплектность:

– Набор реагентов в одном из вариантов исполнения – 1 шт.

– Дистрибутив с программным обеспечением «СекВарио АнеуПГТ» (версия 1.0) – 1 шт.

– Инструкция по применению – 1 экз.

– Руководство пользователя к программному обеспечению – 1 экз.

– Паспорт – 1 экз.

[1] - NextSeq™ 500/550 Mid Output Kit v2.5 (150 Cycles). Кат. № 20024904. 4 набора входят в эту комплектацию.

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

Дистрибутив с программным обеспечением «СекВарио АнеуПГТ» и руководство пользователя поставляются на электронном носителе (USB-флеш-накопитель) при первой поставке набора реагентов и/или по сети Интернет.

ВНИМАНИЕ! Программное обеспечение «СекВарио АнеуПГТ» предназначено только для совместного применения с набором реагентов АнеуПГТ.

Инструкция по применению набора реагентов и паспорт может предоставляться заказчику на бумажном/электронном носителе или на указанном сайте изготовителя.

3.2 Количество анализируемых образцов

Набор реагентов предназначен для однократного применения и рассчитан на 384 образца (до 384 на 1 запуск секвенатора нуклеиновых кислот NextSeq™ 550Dx с использованием комплекта реагентов для секвенирования NextSeq™ 500/550 High Output Kit v2.5 (75 Cycles) и до 96 образцов на 1 запуск секвенатора нуклеиновых кислот NextSeq™ 550Dx с использованием 1 комплекта реагентов для секвенирования NextSeq™ 500/550 Mid Output Kit v2.5 (150 Cycles)).

2.3 Принцип метода

Метод: Ферментативные реакции фрагментации ДНК и пришивания адаптеров методом ПЦР, качественный анализ.

Принцип метода: в основе работы набора реагентов лежит принцип ферментативной реакции тагментации, где фермент транспозаза Tn5 вносит двухцепочечные разрывы в открытые участки генома и вставляет в области разрывов адаптеры, на которые впоследствии с помощью ПЦР присоединяются индексы, несущие биоинформатическую метку для секвенирования и последующей идентификации образцов ДНК программным обеспечением.

Исследование с применением набора реагентов АнеуПГТ состоит из следующих этапов:

1. Выделение ДНК

Щелочной лизис единичных клеток трофэктодермы.

2. Полногеномная амплификация

3. Подготовка полногеномных библиотек

3.1 Фрагментация и присоединение адаптеров с помощью тагментазы

Фермент транспозаза Tn5 вносит двухцепочечные разрывы в открытые участки генома и вставляет в области разрывов адаптеры.

3.2 Очистка полученного продукта

3.3 Присоединение индексов с помощью ПЦР амплификации

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

Для маркировки библиотек фрагментов ДНК используются индексы (смесь двух олигонуклеотидов, имеющие на 3'-конце последовательность, комплементарную последовательности адаптеров, вставленных ферментом транспозазой), которые имеют уникальную последовательность, позволяющую в дальнейшем программному обеспечению идентифицировать образцы. Маркировка библиотек фрагментов ДНК индексами происходит с помощью ПЦР.

3.4 Очистка библиотеки и отбор продуктов необходимой длины

4. Проведение высокопроизводительного секвенирования

5. Анализ результатов с помощью программного обеспечения СекВарио АнеуПГТ

5.1 Получение входных данных – файлы (BCL/FASTQ)

Начальные этапы обработки данных - процедуры мультиплексирования и генерации файлов данных выполняются на оборудовании производителя приборов (секвенаторов). В результате работы секвенатора получают BCL/FASTQ файлы с данными, соответствующими анализируемым образцам. Формат данных FASTQ представляет собой текстовый формат для хранения биологической последовательности (нуклеотидной последовательности, последовательности нуклеотидных оснований) и его соответствующие показатели качества.

Описание формата доступно в открытых источниках – https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra/docs/submitformats/#fastq-files, https://en.wikipedia.org/wiki/FASTQ_format

Для дальнейшей обработки работы программы с прибора (секвенатора) необходимо получить файлы с данными образцов в формате FASTQ. В зависимости от типа используемых приборов (секвенаторов) данный этап, а также обработка части последующих этапов: определение последовательности ДНК и выравнивание на геном человека, фильтрация ПЦР дубликатов, подсчет количества ридов на участках фиксированной длины и фильтрация ридов по качеству выравнивания, формирование файлов с данными о количестве числа прочтений (*.bam.txt) и метрик качества (*.txt), выполняются программой предварительной обработки данных.

5.2 Определение последовательности ДНК и выравнивание на геном человека

Осуществляется выравнивание ридов на референсную последовательность генома человека (версия GRCh37/hg19). Данные о выравнивании представляются в виде файлов формата BAM (https://samtools.github.io/hts-specs/SAMv1.pdf) и используются для дальнейшей обработки.

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

5.3 Маркировка ПЦР-дубликатов

Выполняется маркировка дубликатов последовательностей ДНК, образовавшихся в результате использования полимеразной цепной реакции (ПЦР) при подготовке библиотек, не несущих дополнительной информации, но добавляющих лишний шум в данные для анализа.

5.4 Подсчет количества ридов на участках фиксированной длины и фильтрация ридов по качеству выравнивания

Выполняется фильтрация ридов по качеству выравнивания. Для этого используется параметр MAPQ (http://samtools.github.io/hts-specs/SAMv1.pdf), характеризующий вероятность того, что местоположение последовательности рида определено правильно. В системе используется значение MAPQ>10. Выполняется подсчет количества ридов, выровненных на участки фиксированной длины (бины), удовлетворяющих качеству выравнивания и не промаркированных как ПЦР-дубликаты.

5.5 Формирование файлов с данными о количестве числа прочтений (.bam.txt) и метрик качества (*.txt)*

Выполняется формирование файла *.bam.txt – в формате текстового файла разделенных знаком табуляции значений числа прочтений в каждом бине (в виде строк, соответствующих каждой хромосоме.

Дополнительно формируется файл в формате *.txt, содержащий данные метрик качества. Формат метрик представляет собой строки с наименованием показателя и его значением.

5.6 Фильтрация неуникальных участков генома

В геноме человека значительная часть последовательности (около 15%) не является уникальной, в связи с чем, определить расположение фрагментов, относящихся к таким последовательностям, не представляется возможным. Для определения неуникальных участков на основании последовательности референсного генома (версия GRCh37/hg19) был сформирован искусственный набор выровненных фрагментов ДНК длиной 160 п.н. На данном этапе обработки, полученные неуникальные фрагменты исключаются из анализа данных образцов.

5.7 GC-коррекция

Процесс пробоподготовки и секвенирования в значительной степени зависит от GC состава фрагментов ДНК. Из-за этого может происходить изменение в представленности фрагментов в зависимости от их GC состава. Для того, чтобы учесть изменения, вносимые в

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

итоговое покрытие хромосом, на данном этапе обработки применяется GC-коррекция, которая проводится методом локальной линейной регрессии с использованием весовой функции (LOESS) (Fan H.C. Noninvasive diagnosis of fetal aneuploidy by shotgun sequencing DNA from maternal blood. / H. C. Fan, Y. J. Blumenfeld, U. Chitkara, L. Hudgins, S. R. Quake // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. – 2008)

5.8 Подсчет копийности хромосом

Для определения числа хромосом производится анализ отклонений покрытия образца от покрытия нормировочных образцов с нормальной плоидностью.

5.9 Контроль качества исследования

В целях контроля качества результатов исследования рассчитывается:

– стандартное отклонение (среднеквадратичное отклонение) (https://ru.wikipedia.org/wiki/Среднеквадратическое_отклонение) отклонений покрытия образца от покрытия нормировочных образцов на каждом участке фиксированной длины (бине). Значение стандартного отклонения не должно превышать 0.3.

– MAPD - измерение вариации охвата прочтений от бина к бину, которое устойчиво к присутствию CNV и является индикатором равномерности амплификации всего генома (https://support.10xgenomics.com/single-cell-dna/software/pipelines/latest/interpret/metrics). Величина значения MAPD не должна превышать значения 0.15.

– число прочтений в данных образца определяется из FASTQ-файлов, полученных с секвенатора. Оно характеризует объем полученных данных для выравнивания и определения покрытия генома для выполнения дальнейшего анализа. Для прохождения контроля принимается значение не менее 1 000 000 прочтений. Доля прочтений, выравненных на геном человека, определяет качества подготовленного образца, отсутствие сторонних примесей в биоматериале. Значение показателя принимается не менее 95%.

5.10 Фильтрация покрытия алгоритмом Савицкого-Голея

Для отсеивания точек со слишком высоким или слишком низким покрытием применяется сглаживание данных с использованием фильтра Савицкого-Голея. Это достигается в процессе, известном как свертка, путем подгонки последовательных подмножеств соседних точек покрытия с помощью полинома низкой степени с помощью метода линейных наименьших квадратов.

5.11 Поиск CNV

Поиск CNV (Copy Number Variation) - отклонения числа копий - необходим для определения наличия или отсутствия в образце отклонений от нормы. Поиск осуществляется

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

с применением алгоритма CBS (Circular Binary Segmentation) (https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15475419/) — цикличного бинарного сегментирования, который позволяет разбивать покрытие каждой хромосомы на участки по уровню покрытия. Участки, покрытие которых отклоняется от нормы на величину, превышающую пороговое значение, являются искомыми CNV.

5.12 Построение генотипа

По найденным на предыдущем этапе CNV (или по их отсутствию) формируется генотип исследуемого образца. Он либо представляет собой список обнаруженных CNV, либо нормальный генотип. Для записи результатов генотипа используется международная система цитогеномной номенклатуры человека 2020 (ISCN 2020: An International System for Human Cytogenomic Nomenclature (2020)).

5.13 Формирование отчета

После выполнения всех процедур формируется отчет с результатами обработки в формате docx-файла. Отчет содержат таблицу с данными о названии обработанного файла, полученный генотип, а также данные для контроля качества и графики покрытия хромосом.

ВНИМАНИЕ! Клинико-диагностическая лаборатория должна провести валидацию набора реагентов АнеуПГТ перед началом процесса (при первичной подготовке библиотек) с использованием референтных образцов.

2.4 Время проведения анализа (не включая проведение секвенирования): от 8 часов.

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

3 АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1 Предел обнаружения

Предел обнаружения – количество ДНК 0,006 нг, что соответствует количеству ДНК человека, полученному из 1 клетки. При использовании меньшего количества ДНК производитель не гарантирует корректную работу набора реагентов.

3.2 Аналитическая специфичность

На этапе оценки амплификации MDA на электрофорезе должно определяться наличие продукта длиной более 10000 п.н.

На этапе оценки библиотеки на капиллярном электрофорезе на электрофореграмме должен определяться пик, имеющий нормальное распределение длин от 200 до 500 п.н. с основным пиком от 300 до 360 п.н.

3.3 Интерферирующие вещества

Потенциально интерферирующими примесями могут быть сперматозоиды, полярные тельца и клетки кумулюса в количестве одной и более клеток. Влияние интерферирующих веществ устраняется с помощью тщательной отмывки клеток эмбриона и тестированием последней промывочной капли в качества отрицательного контроля.

3.4 Положительное и отрицательное процентное согласие

Положительное процентное согласие (PPA) составляет 97,67% CI (95% доверительный интервал) 87,71-99,94%.

Отрицательное процентное согласие (NPA) составляет 100% CI (95% доверительный интервал) 98,10-100%.

3.5 Внутрисерийная и межсерийная воспроизводимость

Внутрисерийная воспроизводимость составляет 100% (95% доверительный интервал 89,11–100%).

Межсерийная воспроизводимость составляет 100% (95% доверительный интервал 89,11–100%).

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

4 МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Организация работы ПЦР-лаборатории, оборудование и материалы должны соответствовать требованиям ГОСТ Р ИСО 15190-2023, методических указаний МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот, при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности», с соблюдением санитарных правил и норм СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней».

Неизвестные образцы рассматриваются как потенциально-опасные. При работе с набором реагентов следует надевать одноразовые перчатки без талька.

При работе с микроорганизмами I-IV групп патогенности выбор типа защитного костюма (рабочей одежды и средств индивидуальной защиты) проводится в строгом соответствии с санитарными правилами и нормами СанПиН 3.3686-21 и определяется видом возбудителя, рабочей зоной, оснащением ее боксами биологической безопасности.

Следует использовать только одноразовые наконечники и пробирки.

Не допускается использование одних и тех же наконечников при обработке различных образцов биологического материала.

К работе с набором реагентов допускается персонал, обученный методам молекулярной диагностики и правилам работы в клинико-диагностической лаборатории.

При использовании набора реагентов для предотвращения контаминации этапы выделения ДНК, ПЦР, детекции результатов амплификации и подготовки библиотек фрагментов ДНК следует проводить в раздельных помещениях или тщательно изолированных зонах, снабженных комплектами полуавтоматических дозаторов, халатами и прочими принадлежностями.

При проведении электрофореза запрещается снимать крышку с электрофоретической камеры, если она подключена к источнику питания.

При работе с включенным трансиллюминатором необходимо пользоваться защитным экраном или специальной защитной маской. Выделение вкДНК следует проводить в боксах микробиологической безопасности II класса. Приготовление реакционной смеси необходимо проводить в ПЦР-боксах.

Запрещается перемещение лабораторного оборудования, в том числе дозаторов, штативов, лабораторной посуды, халатов, головных уборов и пр., а также растворов реагентов из одного помещения в другое.

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

Дозаторы должны быть соответствующим образом поверены (в аккредитованных лабораториях) и промаркированы.

Использованные одноразовые расходные материалы (пробирки, наконечники и др.) должны сбрасываться в специальный контейнер, содержащий дезинфицирующий раствор (при необходимости).

Поверхности рабочих столов, а также помещений, в которых проводится ПЦР, следует обязательно, до и после проведения работ, облучать с помощью бактерицидных установок в течение 30 минут.

Все поверхности в лаборатории (рабочие столы, штативы, оборудование и др.) ежедневно подвергают влажной уборке с применением дезинфицирующих/моющих средств, регламентированных санитарными правилами и нормами СанПиН 3.3686-21.

ВНИМАНИЕ! Утилизировать отходы с продуктами ПЦР необходимо только в закрытом виде. Не допускается открывать пробирки после амплификации за исключением этапов проведения детекции методом гель-электрофореза и подготовки библиотек, которые проводят в зоне 4 (МУ 1.3.2569-09).

При использовании набора реагентов в клинико-диагностической лаборатории образуются отходы класса В, которые утилизируются в соответствии с требованиями санитарных правил и норм СанПиН 2.1.3684-21 «Санитарно-эпидемиологические требования к содержанию территорий городских и сельских поселений, к водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий».

При работе с набором реагентов использовать средства индивидуальной защиты для предотвращения контакта с организмом человека. После окончания работы тщательно вымыть руки. Избегать контакта с кожей, глазами и слизистыми оболочками. При контакте с реагентом незамедлительно снять пропитанную им одежду, обильно промыть пораженный участок под проточной прохладной водой и при необходимости обратиться за медицинской помощью.

При использовании по назначению и соблюдении мер предосторожности, контакт с организмом человека исключён.

В соответствии с информацией производителя покупного изделия комплект реагентов для секвенирования NextSeq™ 500/550 High Output Kit v2.5 (75 cycles) и NextSeq™ 500/550 Mid Output Kit v2.5 (150 cycles), Иллюмина, Инк, США, а именно, картридж с

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

реагентами (ячейка 6) содержит формамид, который является репродуктивным токсином (H360). Может наносить вред при вдыхании, заглатывании, попадании на кожу или в глаза. Меры предосторожности и указания на риски: H313+H333, H351, H360FD, H373, P201+P202, P260, P280, P308+P311, P312, P501.

Опасные компоненты в наборе реагентов

Компонент набора реагентов	Наличие/отсутствие опасного компонента	Указание на риски
Реагент LYS	Нет опасных веществ	-
Реагент NEU	Нет опасных веществ	-
Реагент MDA	Нет опасных веществ	-
Фермент-PHI	Нет опасных веществ	-
Реагент MQ	Нет опасных веществ	-
Реагент TRB	**Диметилформамид**	H313, H333, H351, H360, H373
Фермент-TN5	Нет опасных веществ	
Реагент ST	**Додецилсульфат натрия**	H302+H332, H313, H315, H318, H335, H412
Раствор МЧ Pure	Нет опасных веществ	-
Реагент AMP	Нет опасных веществ	-
Фермент-TAT	Нет опасных веществ	-
Индексы set A	Нет опасных веществ	-
Индексы set B	Нет опасных веществ	-
Индексы set C	Нет опасных веществ	-
Индексы set D	Нет опасных веществ	-
Раствор МЧ SizeS	Нет опасных веществ	-
Реагент TEL	Нет опасных веществ	-

Расшифровка обозначений: H302 – Вредно при проглатывании; H313 – Может причинить вред при попадании на кожу; H315 – При попадании на кожу вызывает раздражение; H318 - При попадании в глаза вызывает необратимые последствия; H332 – Вредно при вдыхании; H333 – Может причинять вред при вдыхании; H335 – Может вызывать раздражение верхних дыхательных путей; H351 – Предполагается, что данное вещество вызывает раковые заболевания; H360 – Может отрицательно повлиять на способность к деторождению или на неродившегося ребенка; 373 – Может поражать органы в результате многократного или продолжительного воздействия; H412 – Вредно для водных организмов с долгосрочными последствиями.

Не использовать набор реагентов:

- при нарушении условий транспортирования и хранения;
- при несоответствии внешнего вида реагентов, указанного в паспорте к набору реагентов;
- при нарушении внутренней упаковки компонентов набора реагентов;
- по истечению срока годности.

Примечание – Набор реагентов **не содержит** материалов биологического происхождения, веществ в концентрациях, обладающих канцерогенным, мутагенным действием, а также влияющих на репродуктивную функцию человека. При использовании по назначению и соблюдении мер предосторожности является безопасным.

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

5 ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

При работе с набором реагентов требуются следующие оборудование, реагенты и расходные материалы:

- ПЦР-бокс;
- амплификатор с нагреваемой крышкой под ПЦР-пробирки объёмом 0,2 мл/термоциклер планшетного типа с нагреваемой крышкой [1];
- Секвенатор нуклеиновых кислот NextSeq™ 550Dx, методом секвенирования нового поколения (NGS), «Иллюмина Инк», США, РУ №РЗН 2021/13216;
- микроцентрифуга-вортекс;
- Устройство для электрофореза нуклеиновых кислот в агарозных и акриламидных гелях УЭФ-01-"ДНК-Техн." по ТУ 9443-002-46482062-2002, ООО «НПО ДНК-Технология», Россия, РУ № ФСР 2012/13645;
- камера для горизонтального электрофореза, ООО «НПФ Хеликон», Россия;
- Высокоскоростной шейкер для планшетов и пробирок MPS-1, «BioSan», Латвия;
- Центрифуга медицинская лабораторная LMC-3000, с ротором для микропланшетов ПЦР 96 лунок и глубоколуночных планшетов, «BioSan», Латвия, РУ № ФСЗ 2008/01792;
- флуориметр Qubit, «ThermoFisher Scientific», США;
- система автоматизированного электрофореза TapeStation4200, «Agilent», США;
- магнитный штатив для работы с пробирками объёмом 1,5 мл;
- магнитный штатив на 96 мест для работы с глубоколуночными планшетами и микропланшетами ПЦР;
- холодильник с морозильной камерой;
- морозильник бытовой;
- штатив «рабочее место» для пробирок объёмом 2,0 мл;
- штатив «рабочее место» для пробирок объёмом 1,5 мл;
- штатив «рабочее место» для пробирок объёмом 0,5 мл;
- штатив «рабочее место» для стрипованных пробирок объёмом 0,2 мл;
- маркер длин ДНК (DNA Ladder 1 kb);
- набор реагентов для анализа полученной библиотеки на автоматическом флуоресцентном анализаторе TapeStation4200 – Agilent High Sensitivity DNA Kit,

[1] - требуемые параметры амплификаторов указаны ниже

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

«Agilent», США;

- набор реагентов для измерения концентрации ДНК - Qubit dsDNA HS Assay Kit, «ThermoFisher Scientific», США;
- дозаторы механические переменного объёма одноканальные, позволяющие отбирать объём жидкости от 0,5 до 10 мкл, от 2,0 до 20 мкл, от 20 до 200 мкл, от 100 до 1000 мкл;
- дозаторы механические переменного объёма восьмиканальные, позволяющие отбирать объём жидкости от 0,5 до 10 мкл, от 10 до 300 мкл;
- одноразовые наконечники с фильтром, свободные от РНКаз и ДНКаз, вместимостью 10 мкл, 200 мкл, 1000 мкл;
- одноразовые наконечники без фильтра, свободные от РНКаз и ДНКаз, вместимостью 10 мкл, 200 мкл, 1000 мкл;
- штатив для дозаторов;
- пробирки амплификационные объёмом 0,2 мл (стрипованные), 0,5 мл, 1,5 мл с крышками, свободные от РНКаз и ДНКаз;
- микропланшет ПЦР 96 лунок;
- адгезивная плёнка для планшетов;
- Пробирки DNA LoBind, объёмом 1,5мл, «Эппендорф АГ», Германия, РУ № ФСЗ 2009/04520;
- одноразовые перчатки медицинские, без талька, текстурированные;
- ёмкость для сброса использованных наконечников, пробирок и других расходных материалов;
- дезинфицирующее средство.

Набор реагентов применяется с амплификаторами планшетного типа зарегистрированными в установленном порядке в РФ и соответствующими следующим требованиям:

- обеспечивается работа с объёмом реакционной смеси 4,0 мкл, 25 мкл, 50 мкл;
- подогреваемая крышка с температурой более 100 °С;
- скорость нагрева не менее 2 °С/с;
- скорость охлаждения не менее 1 °С/с;
- точность поддержания и однородность температуры не более ± 0,4 °С.

Для работы с набором реагентов валидирован следующий детектирующий амплификатор:

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

- Амплификатор детектирующий «ДТпрайм» по ТУ 9443-004-96301278-2010 (модификация «ДТпрайм *М*»), ООО «НПО ДНК-Технология», Россия, РУ № ФСР 2011/10229, далее по тексту - «ДТпрайм».

По вопросам применения детектирующих амплификаторов, не указанных выше, требуется согласование с производителем набора реагентов.

6 АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

6.1 Материал для исследования

Для исследования используют единичные клетки трофэктодермы.

Взятие материала проводится в лабораториях ЭКО согласно нормативным документам и внутренним протоколам клиники.

6.2 Транспортирование и хранение образцов биологического материала

Транспортировать и хранить клетки для исследования следует в промаркированных микроцентрифужных пробирках объёмом 0,2 мл с 3,0 мкл специализированного PBS буфера при температуре от минус 70 °С до минус 20°С.

В Н И М А Н И Е ! Не допускается перемещение буфера с клетками из исходной пробирки в другие пробирки или в микропланшеты.

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

7 ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

7.1 Выделение ДНК и проведение полногеномной амплификации

Работа на данном этапе проводится на холодном блоке.

7.1.1 Извлеките из морозильной камеры и разместите на рабочем столе, на холодном блоке, промаркированные пробирки с биоматериалом.

7.1.2 Инкубируйте пробирки с реагентом LYS и реагентом NEU при комнатной температуре (от 18 °С до 25 °С) до полного размораживания содержимого. Встряхните пробирки на микроцентрифуге-вортексе в течение 3-5 с и центрифугируйте на микроцентрифуге-вортексе в течение 1-3 с.

7.1.3 Осторожно добавьте в каждую промаркированную пробирку с биоматериалом по 1,0 мкл реагента LYS, не касаясь содержимого пробирки (отдельным наконечником для каждой пробирки).

7.1.4 Закройте пробирки. Перемешайте содержимое постукиванием по стенке пробирки. Центрифугируйте на микроцентрифуге-вортексе в течение 1-3 с.

ВНИМАНИЕ! Не пипетируйте содержимое и не встряхивайте пробирки на микроцентрифуге-вортексе.

7.1.5 Установите пробирки в блок амплификатора и проведите реакцию с учётом объёма реакционной смеси, равного 4,0 мкл, по программе, приведенной в таблице 1.

Таблица 1 – Программа термостатирования

№ блока	Температура, °С	Время		Число циклов	Режим оптических измерений	Тип блока
		мин	с			
1	65,0	10	00	1		Цикл
2	4,0	…	…	Хранение		Хранение

7.1.6 После окончания термостатирования извлеките пробирки из амплификатора и поставьте на холодный блок на рабочем столе.

7.1.7 Осторожно добавьте в каждую промаркированную пробирку с биоматериалом и реагентом LYS отдельным наконечником, не касаясь содержимого пробирки, по 2,0 мкл реагента NEU.

7.1.8 Закройте пробирки. Перемешайте содержимое постукиванием по стенке пробирки. Центрифугируйте на микроцентрифуге-вортексе в течение 1-3 с.

ВНИМАНИЕ! Не пипетируйте содержимое и не встряхивайте пробирки на микроцентрифуге-вортексе.

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

7.1.9 Инкубируйте пробирку с реагентом MDA при комнатной температуре (от 18 °С до 25 °С) до полного размораживания содержимого. Встряхните пробирку на микроцентрифуге-вортексе в течение 3-5 с и центрифугируйте на микроцентрифуге-вортексе в течение 1-3 с.

7.1.10 Встряхните пробирку с ферментом-PHI на микроцентрифуге-вортексе в течение 3-5 с и центрифугируйте на микроцентрифуге-вортексе в течение 1-3 с.

ВНИМАНИЕ! Фермент-PHI необходимо доставать из морозильной камеры непосредственно перед использованием.

7.1.11 Приготовьте смесь реагента MDA с ферментом-PHI. Для этого смешайте в отдельной одноразовой пробирке объёмом 1,5 мл:

- 18 х (N+1) мкл реагента MDA,
- 1,0 х (N+1) мкл фермента-PHI,

где N – количество неизвестных образцов.

ВНИМАНИЕ! Смесь не подлежит хранению.

7.1.12 Закройте пробирку, встряхните пробирку на микроцентрифуге-вортексе в течение 3-5 с и центрифугируйте на микроцентрифуге-вортексе в течение 1-3 с.

7.1.13 Осторожно добавьте в каждую промаркированную пробирку с биоматериалом и реагентами LYS и NEU отдельным наконечником, не касаясь содержимого пробирки, по 19 мкл приготовленной смеси реагента MDA с ферментом-PHI.

7.1.14 Закройте пробирки. Перемешайте содержимое постукиванием по стенке пробирки. Центрифугируйте на микроцентрифуге-вортексе в течение 1-3 с.

ВНИМАНИЕ!

1. Не пипетируйте содержимое и не встряхивайте пробирки на микроцентрифуге-вортексе.

2. После добавления смеси реагента MDA с ферментом-PHI в пробирки с биоматериалом и реагентами LYS и NEU необходимо сразу же выполнить 7.1.15.

7.1.15 Установите пробирки в блок амплификатора и проведите реакцию амплификации, с учетом объёма реакционной смеси, равного 25 мкл, по программе, приведенной в таблице 2.

Таблица 2 – Программа амплификации

№ блока	Температура, °С	Время		Число циклов	Режим оптических измерений	Тип блока
		мин	с			
1	31,0	60	00	1		Цикл
2	65,0	10	00	1		Цикл

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

3	10,0	…	…	Хранение		Хранение

7.2 Оценка качества и количества полученных ампликонов

7.2.1 По окончании реакции амплификации проанализируйте результаты методом горизонтального гель-электрофореза.

7.2.2 Осторожно внесите в лунки 1,0-2,0% агарозного геля под буфер по 3,0 мкл продуктов амплификации (отдельным наконечником из каждой пробирки). В соседние с первой и последней лунками агарозного геля, в которые внесены продукты амплификации, внесите по 3,0 мкл маркера длин ДНК (DNA Ladder 1 kb).

7.2.3 Наденьте защитную маску или установите защитный экран, включите трансиллюминатор и проанализируйте полученные результаты. Продукт амплификации виден в ультрафиолетовом свете (длина волны 254 нм или 310 нм) в виде светящейся полосы красно-оранжевого цвета.

7.2.4 В дорожках геля, в которые были внесены продукты амплификации, должны быть видны светящиеся полосы оранжево-красного цвета размером более 10000 п.н.

7.3 Подготовка полногеномной библиотеки

7.3.1 **Фрагментация ДНК**

7.3.1.1 Промаркируйте необходимое количество пустых микропланшетов ПЦР 96 лунок (в зависимости от количества образцов).

7.3.1.2 Внесите в каждую лунку микропланшета по 25 мкл реагента MQ.

7.3.1.3 Осторожно добавьте в каждую лунку микропланшета по 5,0 мкл продуктов амплификации (отдельным наконечником из каждой пробирки).

7.3.1.4 Зафиксируйте в протоколе постановки расположение образцов в микропланшете.

7.3.1.5 Встряхните пробирки с реагентом TRB и ферментом-TN5 на микроцентрифуге-вортексе в течение 3-5 с и центрифугируйте на микроцентрифуге-вортексе в течение 1-3 с.

ВНИМАНИЕ! Фермент-TN5 необходимо доставать из морозильной камеры непосредственно перед использованием.

7.3.1.6 Приготовьте смесь реагента TRB с ферментом-TN5. Для этого смешайте в отдельной одноразовой пробирке объёмом 1,5 мл:

- 18,5 x (N+1) мкл Реагента TRB,
- 1,5 x (N+1) мкл Фермента-TN5,

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

где N – количество неизвестных образцов.

ВНИМАНИЕ! Смесь не подлежит хранению.

7.3.1.7 Закройте пробирку, встряхните пробирку на микроцентрифуге-вортексе в течение 3-5 с и центрифугируйте на микроцентрифуге-вортексе в течение 1-3 с.

7.3.1.8 Осторожно добавьте в каждую лунку микропланшета по 20 мкл приготовленной смеси реагента TRB с ферментом-TN5 (отдельным наконечником для каждой лунки).

ВНИМАНИЕ! После добавления смеси реагента TRB с ферментом-TN5 в лунки микропланшета необходимо сразу же выполнить 7.3.1.9 – 7.3.1.10.

7.3.1.9 Тщательно заклейте планшет адгезивной плёнкой, встряхните на шейкере при 1800 об/мин в течение 5-7 с и центрифугируйте при RCF(g) 100 в течение 5 с.

7.3.1.10 Установите планшет в блок амплификатора и проведите реакцию с учетом объёма реакционной смеси, равного 50 мкл по программе, приведенной в таблице 3.

Таблица 3 – Программа термостатирования

№ блока	Температура, °С	Время		Число циклов	Режим оптических измерений	Тип блока
		мин	с			
1	55,0	5	00	1		Цикл
2	4,0	…	…	Хранение		Хранение

7.3.1.11 Встряхните флакон с раствором МЧ Pure на микроцентрифуге-вортексе в течение 3-5 с до получения раствора равномерного коричневого цвета. Инкубируйте при комнатной температуре (от 18 °С до 25 °С) не менее 30 минут.

ВНИМАНИЕ! Перед каждым последующим использованием необходимо встряхнуть флакон с реагентом МЧ Pure на микроцентрифуге-вортексе в течение 3-5 с до получения раствора равномерного коричневого цвета.

7.3.1.12 После окончания термостатирования оставьте микропланшет в амплификаторе на 2 мин (для остывания).

7.3.2 **Отмывка фрагментов ДНК после фрагментации и постановка амплификации**

7.3.2.1 Извлеките микропланшет из амплификатора и поместите на рабочий стол.

7.3.2.2 Инкубируйте микропланшет на рабочем столе при комнатной температуре (от 18 °С до 25 °С) в течение 2 минут.

7.3.2.3 Центрифугируйте микропланшет при RCF(g) 100 в течение 5 с.

7.3.2.4 Встряхните пробирку с реагентом ST на микроцентрифуге-вортексе в течение 3-5 с и центрифугируйте на микроцентрифуге-вортексе в течение 1-3 с.

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

7.3.2.5 Аккуратно снимите адгезивную плёнку с микропланшета, избегая разбрызгивания жидкости.

7.3.2.6 Осторожно добавьте в каждую лунку микропланшета по 10 мкл реагента ST (отдельным наконечником для каждой лунки).

7.3.2.7 Тщательно заклейте микропланшет адгезивной плёнкой, встряхните на шейкере при 1800 об/мин в течение 5-7 с и центрифугируйте при RCF(g) 100 в течение 1-3 с.

7.3.2.8 Инкубируйте микропланшет на рабочем столе при комнатной температуре (от 18 °С до 25 °С) в течение 5 минут.

7.3.2.9 Аккуратно снимите адгезивную плёнку с микропланшета, избегая разбрызгивания жидкости.

7.3.2.10 Осторожно добавьте в каждую лунку микропланшета по 108 мкл раствора МЧ Pure (отдельным наконечником для каждой лунки).

7.3.2.11 Тщательно заклейте микропланшет адгезивной плёнкой, встряхните микропланшет на шейкере при 2600 об/мин в течение 5-7 с.

7.3.2.12 Инкубируйте микропланшет на рабочем столе при комнатной температуре (от 18 °С до 25 °С) в течение 5 минут.

7.3.2.13 Приготовьте 80% этанол. Для этого смешайте в отдельном флаконе:

- 1,0 х (N+1) мл 96% этанола
- 200 х (N+1) мкл деионизированной воды,

где N – количество неизвестных образцов.

ВНИМАНИЕ! Срок хранения 80% этанола не более 3-х дней. По истечении этого срока следует приготовить новый раствор.

7.3.2.14 Центрифугируйте микропланшет при RCF(g) 100 в течение 5 с.

7.3.2.15 Поместите микропланшет на магнитный штатив.

7.3.2.16 Аккуратно снимите адгезивную плёнку с микропланшета.

7.3.2.17 Инкубируйте микропланшет на магнитном штативе при комнатной температуре (от 18 °С до 25 °С) в течение 5 минут либо до тех пор, пока все магнитные частицы не соберутся у стенок лунок.

7.3.2.18 Удалите надосадочную жидкость с помощью дозатора, не задевая магнитные частицы.

7.3.2.19 Добавьте в каждую пробирку по 200 мкл 80% этанола.

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

7.3.2.20 Тщательно заклейте микропланшет адгезивной плёнкой, встряхните микропланшет на шейкере при 1800 об/мин в течение 5-7 с и центрифугируйте при RCF(g) 100 в течение 5 с.

7.3.2.21 Поместите микропланшет на магнитный штатив.

7.3.2.22 Аккуратно снимите адгезивную плёнку с микропланшета.

7.3.2.23 Удалите надосадочную жидкость с помощью дозатора, не задевая магнитные частицы.

7.3.2.24 Повторите 7.3.2.19 – 7.3.2.23 однократно.

7.3.2.25 Тщательно заклейте микропланшет адгезивной плёнкой и центрифугируйте при RCF(g) 100 в течение 5 с.

7.3.2.26 Поместите микропланшет в магнитный штатив, аккуратно снимите адгезивную плёнку с микропланшета, осторожно уберите оставшуюся жидкость со дна лунок, не задевая магнитные частицы, с помощью дозатора, позволяющего отбирать объёмы жидкости от 2,0 до 20 мкл.

7.3.2.27 Инкубируйте микропланшет на магнитном штативе при комнатной температуре (от 18 °С до 25 °С) в течение 4 мин.

7.3.2.28 Извлеките микропланшет из магнитного штатива и поместите на рабочий стол.

7.3.2.29 Осторожно добавьте в каждую лунку микропланшета по 26 мкл реагента MQ (отдельным наконечником для каждой лунки).

7.3.2.30 Заклейте планшет адгезивной плёнкой, встряхните микропланшет на шейкере при 1800 об/мин в течение 5-7 с и центрифугируйте при RCF(g) 100 в течение 5 с.

7.3.2.31 Инкубируйте микропланшет на рабочем столе при комнатной температуре (от 18 °С до 25 °С) в течение 5 мин.

7.3.2.32 Центрифугируйте микропланшет при RCF(g) 100 в течение 5 с.

7.3.2.33 Поместите микропланшет на магнитный штатив.

7.3.2.34 Инкубируйте планшет или планшеты (в зависимости от количества образцов) с индексами при комнатной температуре (от 18 °С до 25 °С) до полного размораживания содержимого. Промаркируйте каждый планшет. Встряхните планшет на шейкере при 1800 об/мин в течение 5-7 с и центрифугируйте при RCF(g) 100 в течение 5 с. Снимите пластиковую крышку.

ВНИМАНИЕ! Не снимайте фольгу с планшетов с индексами и не прокалывайте её.

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

7.3.2.35 Встряхните пробирки с реагентом AMP и ферментом-TAT на микроцентрифуге-вортексе в течение 3-5 с и центрифугируйте на микроцентрифуге-вортексе в течение 1-3 с.

ВНИМАНИЕ! Фермент-TAT необходимо доставать из морозильной камеры непосредственно перед использованием.

7.3.2.36 Приготовьте смесь реагента AMP с ферментом-TAT. Для этого смешайте в отдельной одноразовой пробирке объёмом 1,5 мл:

- 14,5 х (N+1) мкл реагента AMP,
- 0,5 х (N+1) мкл фермента-TAT,

где N – количество неизвестных образцов.

ВНИМАНИЕ! Смесь не подлежит хранению.

7.3.2.37 Закройте пробирку, встряхните пробирку на микроцентрифуге-вортексе в течение 3-5 с и центрифугируйте на микроцентрифуге-вортексе в течение 1-3 с.

7.3.2.38 Осторожно добавьте в каждую лунку планшета с индексами, протыкая фольгу, по 15 мкл приготовленной смеси реагента AMP с ферментом-TAT (отдельным наконечником для каждой лунки).

7.3.2.39 Аккуратно снимите адгезивную плёнку с микропланшета, находящегося на магнитном штативе.

7.3.2.40 Перенесите в соответствующие лунки планшета с индексами по 25 мкл жидкости из лунок микропланшета в магнитном штативе, не задевая магнитные частицы.

ВНИМАНИЕ! После внесения образцов в лунки планшета с индексами необходимо сразу же выполнить 7.3.2.41 – 7.3.2.43.

7.3.2.41 Тщательно заклейте планшет с индексами и образцами адгезивной плёнкой, встряхните планшет на шейкере при 1800 об/мин в течение 5-7 с и центрифугируйте при RCF(g) 100 в течение 5 с.

7.3.2.42 Зафиксируйте в протоколе постановки соответствие образцов и индексов.

7.3.2.43 Установите планшет в блок амплификатора и проведите реакцию амплификации, с учетом объёма реакционной смеси, равного 50 мкл, по программе, приведенной в таблице 4.

Таблица 4 – Программа амплификации

№ блока	Температура, °С	Время		Число циклов	Режим оптических измерений	Тип блока
		мин	с			
1	72,0	3	00	1		Цикл
2	98,0	3	00	1		Цикл

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

3	98,0	0	20	10		Цикл
	60,0	0	30			
	72,0	1	00			
4	72,0	3	00	1		Цикл
3	10,0	…	…	Хранение		Хранение

ВНИМАНИЕ! Если после окончания амплификации предполагается хранение планшета с индексами и образцами (7.3.3.1), внесение реагентов в микропланшеты «77+88» и «20» (7.3.2.44 – 7.3.2.48) необходимо проводить непосредственно перед началом отмывки фрагментов ДНК после амплификации и отбора продуктов необходимой длины (7.3.3). Не допускается хранение микропланшетов с внесёнными реагентами!

7.3.2.44 Встряхните флакон с раствором МЧ SizeS на микроцентрифуге-вортексе до получения раствора равномерного коричневого цвета. Инкубируйте при комнатной температуре (от 18 °С до 25 °С) не менее 30 минут.

ВНИМАНИЕ! Перед каждым последующим использованием необходимо встряхнуть флакон с реагентом МЧ SizeS на микроцентрифуге-вортексе до получения раствора равномерного коричневого цвета.

7.3.2.45 Промаркируйте необходимое количество пустых микропланшетов ПЦР 96 лунок (в зависимости от количества образцов), обозначив их «77+88».

7.3.2.46 Внесите в каждую лунку микропланшета по 77 мкл реагента MQ и по 88 мкл раствора МЧ SizeS.

7.3.2.47 Промаркируйте необходимое количество пустых микропланшетов ПЦР 96 лунок (в зависимости от количества образцов), обозначив их «20».

7.3.2.48 Внесите в каждую лунку микропланшета по 20 мкл раствора МЧ SizeS.

7.3.3 **Отмывка фрагментов ДНК после амплификации и отбор продуктов необходимой длины**

7.3.3.1 После окончания амплификации извлеките планшет с индексами и образцами из амплификатора и поместите на рабочий стол.

Примечание – После окончания амплификации также допускается хранение планшета с индексами и образцами при температуре от 2 °С до 8 °С или в амплификаторе в режиме хранения в течение 24 часов.

7.3.3.2 Центрифугируйте планшет с индексами и образцами при RCF(g) 100 в течении 5 с.

7.3.3.3 Аккуратно снимите адгезивную плёнку с планшета с индексами и образцами.

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

7.3.3.4 Перенесите в соответствующие лунки микропланшета «77+88» по 45 мкл амплификата из лунок планшета с индексами и образцами, прошедшими амплификацию.

7.3.3.5 Тщательно заклейте микропланшет «77+88» адгезивной плёнкой, встряхните микропланшет «77+88» на шейкере при 2600 об/мин в течение 5-7 с.

7.3.3.6 Инкубируйте микропланшет «77+88» на рабочем столе при комнатной температуре (от 18 °С до 25 °С) в течение 5 минут.

7.3.3.7 Центрифугируйте микропланшет «77+88» при RCF(g) 100 в течение 5 с.

7.3.3.8 Поместите микропланшет «77+88» на магнитный штатив.

7.3.3.9 Аккуратно снимите адгезивную пленку с микропланшета «77+88».

7.3.3.10 Инкубируйте микропланшет «77+88» на магнитном штативе при комнатной температуре (от 18 °С до 25 °С) в течение 5 минут либо до тех пор, пока все магнитные частицы не соберутся у стенок лунок.

7.3.3.11 Перенесите в соответствующие лунки микропланшета «20» по 200 мкл жидкости из лунок микропланшета «77+88» в магнитном штативе, не задевая магнитные частицы.

7.3.3.12 Тщательно заклейте микропланшет «20» адгезивной плёнкой, встряхните микропланшет «20» на шейкере при 2600 об/мин в течение 5-7 с.

7.3.3.13 Инкубируйте микропланшет «20» на рабочем столе при комнатной температуре (от 18 °С до 25 °С) в течение 5 минут.

7.3.3.14 Центрифугируйте микропланшет «20» при RCF(g) 100 в течение 5 с.

7.3.3.15 Поместите микропланшет «20» на магнитный штатив.

7.3.3.16 Аккуратно снимите адгезивную плёнку с микропланшета «20».

7.3.3.17 Инкубируйте микропланшет «20» на магнитном штативе при комнатной температуре (от 18 °С до 25 °С) в течение 5 минут либо до тех пор, пока все магнитные частицы не соберутся у стенок лунок.

7.3.3.18 Удалите надосадочную жидкость с помощью дозатора, не задевая магнитные частицы.

7.3.3.19 Добавьте в каждую лунку микропланшета «20» по 200 мкл 80% этанола.

7.3.3.20 Тщательно заклейте микропланшет «20» адгезивной плёнкой, встряхните микропланшет «20» на шейкере при 1800 об/мин в течение 5-7 с и центрифугируйте при RCF(g) 100 в течение 5 с.

7.3.3.21 Поместите микропланшет «20» на магнитный штатив.

7.3.3.22 Аккуратно снимите адгезивную плёнку с микропланшета «20».

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

7.3.3.23 Удалите надосадочную жидкость с помощью дозатора, не задевая магнитные частицы.

7.3.3.24 Повторите 7.3.3.19 – 7.3.2.23 однократно.

7.3.3.25 Тщательно заклейте микропланшет «20» адгезивной плёнкой и центрифугируйте при RCF(g) 100 в течение 5 с.

7.3.3.26 Поместите микропланшет «20» на магнитный штатив, аккуратно снимите адгезивную плёнку с микропланшета, осторожно уберите оставшуюся жидкость со дна, не задевая магнитные частицы, с помощью дозатора, позволяющим отбирать объёмы жидкости от 2,0 до 20 мкл.

7.3.3.27 Инкубируйте микропланшет «20» на магнитном штативе при комнатной температуре (от 18 °С до 25 °С) в течение 3 мин.

7.3.3.28 Извлеките микропланшет «20» из магнитного штатива.

7.3.3.29 Осторожно добавьте в каждую лунку микропланшета «20» по 41 мкл реагента TEL (отдельным наконечником для каждой лунки).

7.3.3.30 Заклейте микропланшет «20» адгезивной плёнкой, встряхните планшет «20» на шейкере при 1800 об/мин в течение 5-7 с и центрифугируйте при RCF(g) 100 в течение 5 с.

7.3.3.31 Инкубируйте микропланшет «20» на рабочем столе при комнатной температуре (от 18 °С до 25 °С) в течение 5 мин.

7.3.3.32 Центрифугируйте микропланшет «20» при RCF(g) 100 в течение 5 с.

7.3.3.33 Поместите микропланшет «20» на магнитный штатив.

7.3.3.34 Аккуратно снимите адгезивную плёнку с микропланшета «20».

7.3.3.35 Инкубируйте микропланшет «20» на магнитном штативе при комнатной температуре (от 18 °С до 25 °С) в течение 5 минут либо до тех пор, пока все магнитные частицы не соберутся у стенок лунок.

7.3.3.36 Промаркируйте необходимое количество пустых микропланшетов ПЦР 96 лунок (в зависимости от количества образцов) для библиотеки.

7.3.3.37 Перенесите в соответствующие лунки промаркированного микропланшета по 40 мкл жидкости из лунок микропланшета «20», не извлекая микропланшет «20» из магнитного штатива и не задевая магнитные частицы.

Примечание – Допускается хранение библиотеки при температуре от минус 18 °С до минус 22 °С не более 1 месяца или в морозильной камере на минус 70 °С не более 1 года.

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

8 ОЦЕНКА КОЛИЧЕСТВА И КАЧЕСТВА БИБЛИОТЕКИ

8.1 Проведите оценку количества и качества полученных пулов библиотек на флуориметре или флуоресцентном анализаторе согласно инструкции по применению набора реагентов для измерения концентрации ДНК на флуориметре и руководству по эксплуатации прибора.

Для оценки качественного профиля библиотеки (распределение длин готовых библиотек) можно использовать метод автоматизированного капиллярного электрофореза.

8.2 На полученной электрофореграмме должен определяться пик, имеющий нормальное распределение длин от 200 до 500 п.н. с основным пиком от 300 до 360 п.н. Допускается наличие продуктов длиной более 500 п.н.

8.3 Молярная концентрация библиотеки должна быть не менее 3000 пмоль/л.

Библиотеки готовы для дальнейшего проведения секвенирования.

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

9 ПРОВЕДЕНИЕ СЕКВЕНИРОВАНИЯ

Секвенирование библиотек следует проводить на секвенаторе нуклеиновых кислот NextSeq™ 550Dx (Иллюмина, Инк, США) с использованием комплекта реагентов для секвенирования, согласно Приложению В к данной инструкции и руководству по эксплуатации секвенатора.

Регистрация результатов секвенирования проводится прибором автоматически во время проведения секвенирования. Первичный анализ данных секвенирования осуществляется прибором после завершения программы.

10 АНАЛИЗ ПОЛУЧЕННЫХ ДАННЫХ

Определение количества копий по всем аутосомам и половым хромосомам проводится с помощью программного обеспечения «СекВарио АнеуПГТ» согласно руководству пользователя к программному обеспечению. Программное обеспечение предназначено только для совместного применения с набором реагентов «АнеуПГТ». Рекомендуется пройти обучение. Контактные данные службы клиентской поддержки представлены в разделе 17 инструкции по применению набора реагентов.

Программное обеспечение «СекВарио АнеуПГТ» и руководство пользователя предоставляются на USB-флеш-накопителе или представлено на Интернет-ресурсе компании-производителя.

Информация об Интернет-ресурсе для скачивания программного обеспечения и руководства пользователя будет указана в инструкции к набору реагентов после получения регистрационного удостоверения на медицинское изделие.

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

11 ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ, ХРАНЕНИЕ И ЭКСПЛУАТАЦИЯ

11.1 Транспортирование набора реагентов осуществляют в термоконтейнерах с хладоэлементами всеми видами крытого транспорта.

11.2 Условия транспортирования, хранения и эксплуатации набора реагентов приведены в таблицах 5.1, 5.2.

Таблица 5.1 – Условия транспортирования, хранения и эксплуатации для комплектации A.N.384

Часть x из 3	Наименование	Температура транспортирования	Температура хранения	Температура хранения после вскрытия упаковки
Часть 1 из 3	Комплект реагентов для амплификации MDA			
	Реагент LYS	не выше 8 °С не более 5 суток*	от минус 22 °С до минус 18 °С	от минус 22 °С до минус 18 °С
	Реагент NEU			
	Реагент MDA			
	Фермент-PHI			
Часть 2 из 3	Комплект реагентов для подготовки полногеномных библиотек			
	Реагент TRB	не выше 8 °С не более 5 суток*	от минус 22 °С до минус 18 °С	от минус 22 °С до минус 18 °С
	Фермент-TN5			
	Фермент-TAT			
	Индексы: set A, set B, set C, set D			
Часть 3 из 3	Комплект реагентов для подготовки полногеномных библиотек			
	Реагент MQ	от 2 °С до 25 °С не более 5 суток	от 2 °С до 8 °С	от 2 °С до 8 °С
	Реагент ST			от 15 °С до 30 °С
	Раствор МЧ Pure			от 2 °С до 8 °С
	Реагент AMP			
	Раствор МЧ SizeS			
	Реагент TEL			
*- допустимо транспортирование на сухом льду.				

Таблица 5.2 – Условия транспортирования, хранения и эксплуатации для комплектаций B.N.384 и B.N.96x4

Часть x из 7	Наименование	Температура транспортирования	Температура хранения	Температура хранения после вскрытия упаковки
Часть 1 из 7	Комплект реагентов для амплификации MDA			
	Реагент LYS	не выше 8 °С не более 5 суток*	от минус 22 °С до минус 18°С	от минус 22 °С до минус 18 °С
	Реагент NEU			
	Реагент MDA			
	Фермент-PHI			
Часть 2 из 7	Комплект реагентов для подготовки полногеномных библиотек			
	Реагент TRB	не выше 8 °С не более 5 суток*	от минус 22 °С до минус 18°С	от минус 22 °С до минус 18 °С
	Фермент-TN5			
	Фермент-TAT			
	Индексы: set A, set B, set C, set D			
Часть 3 из 7	Комплект реагентов для подготовки полногеномных библиотек			
	Реагент MQ	от 2 °С до 25 °С не более 5 суток	от 2 °С до 8 °С	от 2 °С до 8 °С
	Реагент ST			от 15 °С до 30 °С
	Раствор МЧ Pure			от 2 °С до 8 °С
	Реагент AMP			
	Раствор МЧ SizeS			

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

Часть x из 7	Наименование	Температура транспортирования	Температура хранения	Температура хранения после вскрытия упаковки
	Реагент TEL			
Часть 4 из 7	Комплект реагентов для секвенирования			
	Буфер HT1	не выше 8 °С не более 5 суток*	от минус 25°С до минус 15 °С	от минус 25°С до минус 15 °С
Часть 5 из 7	Картридж с реагентами	не выше 8 °С не более 5 суток*	от минус 25°С до минус 15 °С	от минус 25°С до минус 15 °С
Часть 6 из 7	Проточная ячейка	от 2 °С до 25 °С не более 5 суток	от 2 °С до 8 °С	от 2 °С до 8 °С
Часть 7 из 7	Картридж с буфером	от 2 °С до 25 °С не более 5 суток	от 15 °С до 30 °С	от 15 °С до 30 °С
*- допустимо транспортирование на сухом льду.				

11.3 Набор реагентов должен применяться согласно действующей версии утвержденной инструкции по применению.

11.4 Наборы реагентов, транспортированные с нарушением температурного режима, применению не подлежат.

11.5 Наборы реагентов, хранившиеся с нарушением регламентированного режима, применению не подлежат.

11.6 Для получения достоверных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции по применению набора реагентов.

11.7 Наборы реагентов с истекшим сроком годности применению не подлежат.

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

12 УКАЗАНИЯ ПО УТИЛИЗАЦИИ

12.1 При использовании набора реагентов в клинико-диагностической лаборатории образуются отходы класса В, которые утилизируются в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.3684-21 и МУ 1.3.2569-09.

12.2 Наборы реагентов, пришедшие в непригодность, в связи с истечением срока годности, повреждением упаковки подлежат утилизации в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.3684-21.

13 ГАРАНТИИ ИЗГОТОВИТЕЛЯ

13.1 Предприятие-изготовитель гарантирует соответствие набора реагентов требованиям технических условий при соблюдении условий транспортирования, хранения и эксплуатации, установленных техническими условиями.

13.2 Срок годности комплектов реагентов (за исключением покупного изделия) – 12 месяцев при соблюдении всех условий транспортирования, хранения и эксплуатации.

Срок годности покупного изделия - согласно информации, указанной производителем.

14 РЕМОНТ И ТЕХНИЧЕСКОЕ ОБСЛУЖИВАНИЕ

Набор реагентов предназначен для однократного использования и не подлежит техническому обслуживанию и текущему ремонту.

15 СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ ПРИ МАРКИРОВКЕ НАБОРА РЕАГЕНТОВ

IVD	Медицинское изделие для диагностики *in vitro*		Обратитесь к инструкции по применению или к инструкции по применению в электронном виде
	Температурный диапазон	REF	Номер по каталогу
Σ	Содержимого достаточно для проведения <n> тестов		Изготовитель
	Использовать до		Не допускать воздействия солнечного света
LOT	Код партии (серии)	NON STERILE	Нестерильно
	Дата изготовления		

Покупные изделия содержат следующие символы:

	Репродуктивная токсичность	!	Осторожно! Содержит раздражающие компоненты

Все используемые при маркировке покупного изделия товарные знаки, логотипы и наименования являются собственностью их соответствующих правообладателей.

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

16 ПЕРЕЧЕНЬ ПРИМЕНЯЕМЫХ НАЦИОНАЛЬНЫХ СТАНДАРТОВ

ГОСТ ISO 14971-2021 Изделия медицинские. Применение менеджмента риска к медицинским изделиям

ГОСТ 15.309-98 Система разработки и постановки продукции на производство. Испытания и приемка выпускаемой продукции. Основные положения

ГОСТ Р 2.105-2019 Единая система конструкторской документации. Общие требования к текстовым документам

ГОСТ Р 15.013-2016 Система разработки и постановки продукции на производство. Медицинские изделия

ГОСТ Р 51088-2013 Медицинские изделия для диагностики ин витро. Реагенты, наборы реагентов, тест-системы, контрольные материалы, питательные среды. Требования к изделиям и поддерживающей документации

ГОСТ Р 51352-2013 Медицинские изделия для диагностики ин витро. Методы испытаний

ГОСТ Р ИСО 15190-2023 Лаборатории медицинские. Требования безопасности

ГОСТ Р ИСО 15223-1-2023 Изделия медицинские. Символы, применяемые для передачи информации, предоставляемой изготовителем. Часть 1. Основные требования

ГОСТ Р ИСО 18113-1-2015 Медицинские изделия для диагностики in vitro. Информация, предоставляемая изготовителем (маркировка). Часть 1. Термины, определения и общие требования

ГОСТ Р ИСО 18113-2-2015 Медицинские изделия для диагностики in vitro. Информация, предоставляемая изготовителем (маркировка). Часть 2. Реагенты для диагностики in vitro для профессионального применения

ГОСТ Р ИСО 23640-2015 Изделия медицинские для диагностики in vitro. Оценка стабильности реагентов для диагностики in vitro

Примечания

1 Указанные выше стандарты были действующими на момент утверждения инструкции по применению. В дальнейшем, при пользовании документом, целесообразно проверить действие ссылочных нормативных документов на текущий момент. Если ссылочный документ заменён или изменён, то при применении настоящего документа следует пользоваться заменённым (изменённым документом).

2 Перечень стандартов, относящихся к программному обеспечению, приведён в руководстве пользователя.

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

17 АДРЕС ДЛЯ ОБРАЩЕНИЯ

Производство наборов реагентов имеет сертифицированную систему менеджмента качества и соответствует требованиям стандарта систем менеджмента качества ISO 9001 в области разработки, производства и продажи IVD реагентов и приборов для молекулярно-генетической диагностики, и другого лабораторного применения, и ISO 13485 в области разработки, производства и продажи IVD реагентов и приборов для медицинской молекулярно-генетической диагностики.

Производитель: Общество с ограниченной ответственностью «ДНК-Технология ТС» (ООО «ДНК-Технология ТС»), Россия.

Адрес производителя: 117246, Россия, г. Москва, проезд Научный, д. 20, строение 4.

Место производства: ООО «ДНК-Технология ТС»
117246, Россия, г. Москва, проезд Научный, д. 20, строение 4

По вопросам, касающимся качества набора реагентов, следует обращаться в службу клиентской поддержки.

Служба клиентской поддержки:
8-800-200-75-15 (для России, звонок бесплатный),
+7 (495) 640-16-93 (для стран СНГ и зарубежья, звонок платный).
E-mail: hotline@dna-technology.ru, www.dna-technology.ru

Научный сотрудник
ООО «ДНК-Технология ТС»,
к.м.н. Янкевич Т. Э.

«12» декабря 2024 г.

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

Приложение А

Перечень индексов

Индексы set A

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	AA1	AA2	AA3	AA4	AA5	AA6	AA7	AA8	AA9	AA10	AA11	AA12
B	AB1	AB2	AB3	AB4	AB5	AB6	AB7	AB8	AB9	AB10	AB11	AB12
C	AC1	AC2	AC3	AC4	AC5	AC6	AC7	AC8	AC9	AC10	AC11	AC12
D	AD1	AD2	AD3	AD4	AD5	AD6	AD7	AD8	AD9	AD10	AD11	AD12
E	AE1	AE2	AE3	AE4	AE5	AE6	AE7	AE8	AE9	AE10	AE11	AE12
F	AF1	AF2	AF3	AF4	AF5	AF6	AF7	AF8	AF9	AF10	AF11	AF12
G	AG1	AG2	AG3	AG4	AG5	AG6	AG7	AG8	AG9	AG10	AG11	AG12
H	AH1	AH2	AH3	AH4	AH5	AH6	AH7	AH8	AH9	AH10	AH11	AH12

Индексы set B

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	BA1	BA2	BA3	BA4	BA5	BA6	BA7	BA8	BA9	BA10	BA11	BA12
B	BB1	BB2	BB3	BB4	BB5	BB6	BB7	BB8	BB9	BB10	BB11	BB12
C	BC1	BC2	BC3	BC4	BC5	BC6	BC7	BC8	BC9	BC10	BC11	BC12
D	BD1	BD2	BD3	BD4	BD5	BD6	BD7	BD8	BD9	BD10	BD11	BD12
E	BE1	BE2	BE3	BE4	BE5	BE6	BE7	BE8	BE9	BE10	BE11	BE12
F	BF1	BF2	BF3	BF4	BF5	BF6	BF7	BF8	BF9	BF10	BF11	BF12
G	BG1	BG2	BG3	BG4	BG5	BG6	BG7	BG8	BG9	BG10	BG11	BG12
H	BH1	BH2	BH3	BH4	BH5	BH6	BH7	BH8	BH9	BH10	BH11	BH12

Индексы set C

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	CA1	CA2	CA3	CA4	CA5	CA6	CA7	CA8	CA9	CA10	CA11	CA12
B	CB1	CB2	CB3	CB4	CB5	CB6	CB7	CB8	CB9	CB10	CB11	CB12
C	CC1	CC2	CC3	CC4	CC5	CC6	CC7	CC8	CC9	CC10	CC11	CC12
D	CD1	CD2	CD3	CD4	CD5	CD6	CD7	CD8	CD9	CD10	CD11	CD12
E	CE1	CE2	CE3	CE4	CE5	CE6	CE7	CE8	CE9	CE10	CE11	CE12
F	CF1	CF2	CF3	CF4	CF5	CF6	CF7	CF8	CF9	CF10	CF11	CF12
G	CG1	CG2	CG3	CG4	CG5	CG6	CG7	CG8	CG9	CG10	CG11	CG12
H	CH1	CH2	CH3	CH4	CH5	CH6	CH7	CH8	CH9	CH10	CH11	CH12

Индексы set D

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	DA1	DA2	DA3	DA4	DA5	DA6	DA7	DA8	DA9	DA10	DA11	DA12
B	DB1	DB2	DB3	DB4	DB5	DB6	DB7	DB8	DB9	DB10	DB11	DB12
C	DC1	DC2	DC3	DC4	DC5	DC6	DC7	DC8	DC9	DC10	DC11	DC12
D	DD1	DD2	DD3	DD4	DD5	DD6	DD7	DD8	DD9	DD10	DD11	DD12
E	DE1	DE2	DE3	DE4	DE5	DE6	DE7	DE8	DE9	DE10	DE11	DE12
F	DF1	DF2	DF3	DF4	DF5	DF6	DF7	DF8	DF9	DF10	DF11	DF12
G	DG1	DG2	DG3	DG4	DG5	DG6	DG7	DG8	DG9	DG10	DG11	DG12
H	DH1	DH2	DH3	DH4	DH5	DH6	DH7	DH8	DH9	DH10	DH11	DH12

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

Приложение Б

Преимплантационное генетическое тестирование на анеуплоидии (ПГТ-А) методом полногеномного высокопроизводительного секвенирования (NGS) состоит из следующих этапов:

№	Этап	Участие набора реагентов «АнеуПГТ»
1	Получение биологического материала	-
2	Выделение ДНК	Комплект реагентов для амплификации MDA
3	Полногеномная амплификация	Комплект реагентов для амплификации MDA
4	Оценка полногеномных ампликонов	-
7	Фрагментация ампликонов	Комплект реагентов для подготовки полногеномных библиотек
5	Очистка фрагментированных ампликонов	Комплект реагентов для подготовки полногеномных библиотек
6	Присоединение индексов	Комплект реагентов для подготовки полногеномных библиотек
7	Очистка библиотек и size select	Комплект реагентов для подготовки полногеномных библиотек
8	Оценка количества и качества полученных библиотек	-
9	ПЦР обогащения	Комплект реагентов для секвенирования
10	Проведение секвенирования	Комплект реагентов для секвенирования
11	Регистрация и обработка результата	Комплект реагентов для секвенирования
12	Анализ полученных данных. Заключение.	Программное обеспечение «СекВарио АнеуПГТ»

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

Приложение В

ПРОВЕДЕНИЕ СЕКВЕНИРОВАНИЯ

I. Подготовка к проведению секвенирования: денатурирование и разбавление библиотек

Подготовка и проведение секвенирования проводится в соответствии с руководством по эксплуатации секвенатора нуклеиновых кислот NextSeq™ 550Dx (Иллюмина, Инк, США).

Данное приложение составлено на основе «Руководства по денатурированию и разбавлению библиотек для системы NextSeq 500 и NextSeq 550 (документ № 15048776)», адаптировано к набору реагентов АнеуПГТ.

Для разведения и денатурирования библиотек требуются следующие реагенты и расходные материалы:

- «HT1 Hyb Buffer 1» (Буфер HT1) из комплекта реагентов для секвенирования;
- 1,0 М раствор NaOH (для молекулярно-биологических исследований);
- деионизированная вода (для молекулярно-биологических исследований);
- реагент PhiX Control производства Иллюмина, Инк, США (Кат. номер FC-110-3001);
- одноразовые пробирки объёмом 1,5 мл, свободные от РНКаз и ДНКаз.

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

1. Подготовка реагентов для денатурирования и разведения библиотек

1.1 Приготовьте свежий раствор 0,2 М NaOH. Для этого смешайте в отдельной одноразовой пробирке объёмом 1,5 мл:

- 400 мкл деионизированной воды;
- 100 мкл 1,0 М раствора NaOH.

1.2 Встряхните пробирку с раствором 0,2 М NaOH на микроцентрифуге-вортексе в течение 3-5 с и центрифугируйте на микроцентрифуге-вортексе в течение 1-3 с.

ВНИМАНИЕ! Приготовленный раствор следует хранить не более 12 часов.

1.3 Разморозьте при комнатной температуре от 18 °С до 25 °С буфер HT1 из комплекта реагентов для секвенирования.

2. Приготовление библиотеки с концентрацией 0,5 нМ

2.1 Готовые библиотеки (см. 8.3) смешайте эквимолярно. Повторите измерение концентрации полученного пула библиотек или рассчитайте его концентрацию.

2.2 Рассчитайте кратность разведения полученной библиотеки.

$$Y = X/0,5$$

где Y – кратность разведения библиотеки (см.2.1)

X – концентрация библиотеки (см.2.1).

2.3 Разведите библиотеку до концентрации 0,5 нМ. Для этого смешайте в отдельной одноразовой пробирке объёмом 1,5 мл:

– 5,0 мкл библиотеки,

– (5,0*Y)-5,0 мкл деионизованной воды,

где Y – кратность разведения для данной библиотеки.

2.4 Встряхните пробирку с библиотекой 0,5 нМ на микроцентрифуге-вортексе в течение 3-5 с и центрифугируйте на микроцентрифуге-вортексе в течение 1-3 с.

3. Денатурирование библиотеки

3.1 Смешайте в отдельной одноразовой пробирке объёмом 1,5 мл:

- 40 мкл Библиотеки 0,5 нМ;
- 40 мкл 0,2 М NaOH.

3.2 Встряхните пробирку на микроцентрифуге-вортексе в течение 3-5 с и центрифугируйте в течение 1-3 с на микроцентрифуге-вортексе.

3.3 Инкубируйте пробирку при комнатной температуре (от 18 °С до 25 °С) в течение 5 мин.

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

3.4 Добавьте в пробирку 40 мкл деионизированной воды. Встряхните пробирку на микроцентрифуге-вортексе в течение 3-5 с и центрифугируйте на микроцентрифуге-вортексе в течение 1-3 с.

4. Приготовление библиотеки с концентрацией 20 пМ

4.1 Разведите библиотеку до 20 пМ:

Для этого добавьте к 120 мкл денатурированной библиотеки 880 мкл буфера HT1, предварительно инкубированного при комнатной температуре (от 18 °C до 25 °C) до полного размораживания.

В результате получится 1,0 мл денатурированной 20 пМ библиотеки.

4.2 Встряхните пробирку на микроцентрифуге-вортексе в течение 3-5 с и центрифугируйте на микроцентрифуге-вортексе в течение 1-3 с.

6. Приготовление библиотеки с концентрацией 1,8 пМ

6.1 Разведите денатурированную библиотеку до 1,8 пМ. Для этого смешайте в отдельной пробирке объёмом 1,5 мл:

- 117 мкл Библиотеки 20 пМ;
- 1183 мкл Буфера HT1.

В результате получится 1,3 мл денатурированной 1,8 пМ библиотеки.

6.2 Встряхните пробирку на микроцентрифуге-вортексе в течение 3-5 с и центрифугируйте на микроцентрифуге-вортексе в течение 1-3 с.

7. Приготовление 4 нМ PhiX Control

7.1 Разведите PhiX Control до 4,0 нМ.

Для этого смешайте в отдельной одноразовой пробирке объёмом 1,5:

- 3,0 мкл деионизированной воды;
- 2,0 мкл PhiX Control (исходная концентрация 10 нМ).

7.2 Встряхните пробирку на микроцентрифуге-вортексе в течение 3-5 с и центрифугируйте на микроцентрифуге-вортексе в течение 1-3 с.

8. Денатурирование PhiX Control

8.1 Денатурируйте 4 нМ PhiX Control.

Для этого в пробирку с PhiX Control (концентрация 4,0 нМ) добавьте 5 мкл 0,2 М NaOH.

8.2 Встряхните пробирку на микроцентрифуге-вортексе в течение 3-5 с и центрифугируйте на микроцентрифуге-вортексе в течение 1-3 с.

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

8.3 Инкубируйте пробирку при комнатной температуре (от 18 °С до 25 °С) в течение 5 мин.

8.4 Добавьте в пробирку 5,0 мкл деионизированной воды. Встряхните пробирку на микроцентрифуге-вортексе в течение 3-5 с и центрифугируйте на микроцентрифуге-вортексе в течение 1-3 с.

9. Приготовление 20 пМ PhiX Control

9.1 Разведите PhiX Control до 20 пМ. Для этого к 15 мкл денатурированного PhiX Control добавьте 985 мкл буфера HT1, предварительно инкубированного при комнатной температуре (от 18 °С до 25 °С) до полного размораживания.

9.2 Встряхните пробирку на микроцентрифуге-вортексе в течение 3-5 с и центрифугируйте на микроцентрифуге-вортексе в течение 1-3 с.

10. Приготовление 1,8 пМ PhiX Control

Разведите PhiX Control до 1,8 пМ.

Для этого смешайте в отдельной одноразовой пробирке:

- 117 мкл PhiX Control 20 пМ;
- 1183 мкл буфера HT1.

11. Приготовление смеси библиотеки и PhiX Control

Смешайте в отдельной одноразовой пробирке:

- - 1287 мкл Библиотеки (1,8 пМ);
- 13 мкл PhiX Control (1,8 пМ).

Библиотека в смеси с PhiX Control готова к загрузке в картридж с реагентами для проведения секвенирования. Смесь библиотеки с PhiX Control следует хранить на льду до загрузки в картридж с реагентами.

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

II. Подготовка реагентов из комплекта реагентов для проведения секвенирования к загрузке в прибор

1. Размораживание картриджа с реагентом

1.1 Извлеките NextSeq™ 500/550 High Output Reagent Cartridge v2 (Картридж с реагентами) из морозильной камеры (картридж хранится при температуре от минус 15 °C до минус 25 °C).

1.2 Поместите картридж с реагентами на водяную баню, содержащую достаточное для погружения основания картриджа с реагентами количество деионизированной воды комнатной температуры (от 18 °C до 25 °C). Не допускайте превышения максимального уровня воды, указанного на картридже с реагентами.

1.3 Картридж с реагентами необходимо размораживать на водяной бане комнатной температуры (от 18 °C до 25 °C) примерно 60 минут или до полного оттаивания.

1.4 Извлеките картридж с реагентами из водяной бани и осторожно постучите им по столу для удаления воды из основания картриджа. Высушите основание картриджа.

2. Проверка картриджа с реагентами

2.1 Переверните картридж с реагентами десять раз, чтобы смешать размороженные реагенты, а затем визуально проверьте, что все позиции разморожены.

2.2 Визуально проверьте реагенты в положениях 29, 30, 31 и 32, чтобы убедиться, что они полностью перемешаны и не содержат осадков.

2.3 Осторожно постучите картридж по столу, чтобы уменьшить количество пузырьков воздуха в реагентах.

Примечание – Сипперы секвенатора NextSeq™ 550Dx опускаются на дно каждого резервуара для всасывания реагентов, поэтому важно, чтобы резервуары были свободны от воздушных пузырьков.

2.4 Поместите картридж с реагентами на лёд или оставьте на время (до 6 часов) при температуре от 2 °C до 8 °C до готовности к работе. Для получения наилучших результатов перейдите непосредственно к загрузке образца и настройке запуска:

Загрузите библиотеку в ячейку 10 картриджа с реагентами, промаркированную Load Library Here (Загрузка образцов).

Используя интерфейс контрольного программного обеспечения NextSeq, выполните шаги настройки запуска, чтобы загрузить проточную ячейку и реагенты, а затем запустите постановку.

III. Проведите запуск секвенатора NextSeq™ согласно руководству по эксплуатации прибора.

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

Прошито, пронумеровано и
скреплено печатью 42
(сорок два) листа (ов)
специалист по регистрации
Сафронова И.Ю.

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

Организация-производитель

СОГЛАСОВАНО

Генеральный директор
ООО «ДНК-Технология ТС»
_____ С.А. Самарин
«25» _____ 2024 г.

Организация-разработчик

УТВЕРЖДАЮ

Генеральный директор
ООО «НПФ ДНК-Технология»
_____ С.П. Левичев
«_____» _____ 2024 г.

Руководство пользователя

Программное обеспечение «СекВарио АнеуПГТ»

Набор реагентов
для выявления хромосомных аномалий в единичных клетках
методом высокопроизводительного секвенирования NGS на платформе Illumina
(АнеуПГТ)

Версия 1.0 от 23.11.2023

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

СОДЕРЖАНИЕ

1 Назначение программы 2

2 Условия выполнения программы 2

2.1 Аппаратное обеспечение 2

2.2 Программное обеспечение 4

2.3 Уровень подготовки пользователя 4

3 Выполнение программы 4

3.1 Запуск программы 4

3.2 Загрузка файлов с результатами секвенирования 5

3.3 Обработка файлов с результатами секвенирования 7

3.4 Аннотирование 7

3.5 Врачебное заключение 11

3.6 Результаты 12

3.7 Фильтрация данных 13

3.8 Забраковывание 13

3.9 История 13

3.10 Архивирование данных 14

4 Настройка программы 14

4.1 Шаблоны отчетов 14

4.2 О программе 15

5 Деинсталляция 15

6 Адрес для обращения 16

Приложение А 17

Приложение Б 17

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

1 НАЗНАЧЕНИЕ ПРОГРАММЫ

Программное обеспечение (далее ПО) «СекВарио АнеуПГТ» предназначено для обработки и интерпретации результатов, полученных с использованием набора реагентов для выявления хромосомных аномалий в единичных клетках методом высокопроизводительного секвенирования NGS на платформе Illumina (АнеуПГТ).

Функции программы

1. Создания списка образцов
2. Загрузка файлов с результатами секвенирования в формате *.bam.txt, *.json.
3. Автоматическая обработка данных, полученных из файлов.
4. Просмотр результатов обработки данных.
5. Формирование врачебного заключения.
6. Сохранение заключения в файл формата *.docx.

Информационная безопасность

В ПО «СекВарио АнеуПГТ» не осуществляется хранение и обработка персональных данных, таким образом к данной программе не применимы нормы и требования по защите персональных данных.

В ПО «СекВарио АнеуПГТ» не предусмотрены встроенные средства защиты от несанкционированного доступа (НД) и от копирования. Защита от НД осуществляется стандартными средствами операционной системы (ОС), а именно настройкой прав пользователей на доступ к программному обеспечению.

2 УСЛОВИЯ ВЫПОЛНЕНИЯ ПРОГРАММЫ

ПО «СекВарио АнеуПГТ» представляет собой клиент-серверное приложение, состоящее из серверных веб-служб обработки запросов к базе данных, установленной на сервере, и веб-клиентов по формированию и отображению результатов их выполнения на персональном компьютере (ПК) пользователя.

Для установки серверной части ПО, а также предоставления пользователям доступа и прав для работы требуется квалификация системного администратора. Процедура установки и настройки системы выполняется сотрудниками компании разработчика либо квалифицированным специалистом, прошедшим обучение в компании разработчика.

Для работы с ПО «СекВарио АнеуПГТ» на ПК пользователя необходимо выполнение нижеприведенных требований к аппаратному и программному обеспечению.

2.1 АППАРАТНОЕ ОБЕСПЕЧЕНИЕ

Минимальные требования к аппаратному обеспечению ПК пользователя и сервера приведены в таблицах 1-2.

Рекомендованные требования к аппаратному обеспечению сервера приведены в таблице 3.

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

Таблица 1 – Минимальные требования к аппаратному обеспечению рабочего ПК пользователя

Наименование	Требования
Процессор	Intel Core i3 2100 / AMD Ryzen 3 1200 и выше
Объем оперативной памяти	Не менее 8 ГБ
Сетевой контроллер	Fast Ethernet 10/100/1000 Base-T или Wi-Fi (WLAN)
Видеоадаптер	Работа с разрешением не ниже 1920x1080 с глубиной цветности не ниже 16 бит
Видеомонитор	ЖК-монитор с рабочим разрешением не менее 1920x1080
Клавиатура	Требуется наличие русифицированной клавиатуры, совместимой с ПК пользователя
Мышь	Требуется наличие двухкнопочной мыши

Таблица 2 – Минимальные требования к аппаратному обеспечению сервера

Наименование	Требования
Количество и тип процессоров	64-разрядный (x64) процессор с тактовой частотой 2.2 ГГц или выше, имеющий не менее 4 ядер, 8 потоков.
Объем оперативной памяти	Не менее 16 ГБ
Сетевой контроллер	Fast Ethernet 10/100/1000 Base-T или Wi-Fi (WLAN)
Дисковая подсистема	Жесткий диск ёмкостью не менее 500 ГБ, обеспечивающий скорость чтения и записи не менее 500 Мбит/с

Таблица 3 – Рекомендованные требования к аппаратному обеспечению сервера

Наименование	Требования
Количество и тип процессоров	64-разрядный (x64) процессор с тактовой частотой 2.2 ГГц или выше, имеющий не менее 24 ядер, 48 потоков.
Объем оперативной памяти	Не менее 64 ГБ
Сетевой контроллер	Fast Ethernet 10/100/1000 Base-T или Wi-Fi (WLAN)
Дисковая подсистема	Жесткий диск ёмкостью не менее 2 ТБ, обеспечивающий скорость чтения и записи не менее 500 Мбит/с

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

2.2 ПРОГРАММНОЕ ОБЕСПЕЧЕНИЕ

Для работы с ПО «СекВарио АнеуПГТ» на ПК пользователя достаточно любой операционной системы с поддержкой веб-браузера версии не ниже Chrome 76.x, Firefox 68.x, а также наличия интернет-соединения либо локальной корпоративной сети с протоколом IP и возможностью соединения с сервером ПО «СекВарио АнеуПГТ». Минимальные требования к программному обеспечению сервера приведены в таблице 4.

Возможен вариант локальной установки сервера на ПК пользователя в случае выполнения требований к аппаратной и программной части ПО «СекВарио АнеуПГТ».

Таблица 4 – Минимальные требования к программному обеспечению сервера

Наименование	Требования
Операционная система	Ubuntu 20.04 LTS
Сервер баз данных (БД)	PostgreSQL версии не ниже 11
Пакеты приложений	OpenJDK версии 11
Текстовый редактор	Текстовый редактор с поддержкой формата *.docx

2.3 УРОВЕНЬ ПОДГОТОВКИ ПОЛЬЗОВАТЕЛЯ

Пользователь ПО «СекВарио АнеуПГТ» должен обладать следующими необходимыми знаниями и навыками для работы с программой:

- знание предметной области и положений нормативных и руководящих документов;
- практические навыки работы с ПК;
- практические навыки работы с графическим пользовательским интерфейсом ОС.

Перед началом работы с ПО «СекВарио АнеуПГТ» необходимо ознакомиться с данным Руководством пользователя.

3 ВЫПОЛНЕНИЕ ПРОГРАММЫ

3.1 ЗАПУСК ПРОГРАММЫ

Для запуска ПО «СекВарио АнеуПГТ»:

1. В адресной строке браузера укажите адрес стартовой страницы, полученный от администратора установленного ПО.
2. Нажмите клавишу <Enter>. На экране отобразится окно авторизации пользователя.
3. Введите логин и пароль учетной записи пользователя, обладающего правами на работу с ПО «СекВарио АнеуПГТ», в соответствующие поля окна авторизации.

Учетные данные пользователя необходимо получить у администратора установленной системы.

4. Нажмите кнопку [Войти].

Если сочетание «Логин – Пароль» указано неверно, на экране появится соответствующее информационное сообщение. В этом случае проверьте корректность имени пользователя и пароля. Обратите внимание на каком языке вводятся данные, не нажата ли клавиша <Caps Lock>.

Если введенные данные учетной записи пользователя верны, то в браузере отобразится стартовая страница ПО «СекВарио АнеуПГТ».

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

На стартовой странице расположены следующие блоки:

- Меню программы – обеспечивает переход к соответствующим разделам ПО «СекВарио АнеуПГТ».
- Строка поиска – позволяет найти нужный образец (по идентификатору).
- Панель инструментов:
  - – [Уведомления] – для отображения списка полученных уведомлений.
  - – [Настройки] – для отображения меню настройки программы.
- Сводная информация об образцах, результатах и пользователях.
- Рабочая область – содержит список последних действий, выполненным авторизованным пользователем в программе.
- Кнопка [Показать/Скрыть меню] для настройки отображения меню программы.
- Панель учетной записи – отражает данные об учетной записи, с помощью которой был осуществлен вход в систему, содержит кнопку [Выход], предназначенную для выхода текущего пользователя из программы.

3.2 ЗАГРУЗКА ФАЙЛОВ С РЕЗУЛЬТАТАМИ СЕКВЕНИРОВАНИЯ

Раздел «Загрузка файлов» исследования «АнеуПГТ» предназначен для создания списка образцов и загрузки данных с результатами секвенирования.

На странице раздела расположены:

- Панель инструментов (таблица 5).
- Панель фильтров.

Некоторые кнопки отображаются на панели инструментов, если в списке образцов выбрана хотя бы одна запись.

- Рабочая область со списком образцов.
- Панель инструментов в строке каждого образца (таблица 6).

Таблица 5 – Кнопки на панели инструментов раздела «Загрузка файлов» и их назначение

Наименование	Изображение	Описание
Загрузить файлы		Загрузка данных с результатами секвенирования образцов
Отправить в архив		Перемещение выбранного образца в архив (Архивирование данных)
Пометить как «Срочный образец»		В строке с записью об образце отобразится иконка Для удаления пометки повторно нажмите на кнопку
Удалить		Удалить отмеченные записи образцов
Экспресс-трекинг		Кнопка вызова процедуры экспресс-трекинга для создания списка образцов

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

Таблица 6 – Кнопки на панели в строке каждого образца

Наименование	Изображение	Описание
Подробнее		Открыть форму для просмотра и редактирования сведений об образце
Новое событие		Добавить запись о событии в историю образца
Показать историю		Открывает окно со списком событий в истории образца

Создание списка образцов

1. Нажмите кнопку [Экспресс-трекинг] на панели инструментов. На экране отобразится окно «Экспресс-трекинг».
2. Введите название запуска.
3. Введите код образца в поле ввода «Код образца».
4. Добавьте образец в список с помощью кнопки [Добавить].
5. В новом поле ввода введите код следующего образца.
6. Повторите действия 4-5 для создания записей всех образцов.
7. Для завершения операции по формированию списка образцов нажмите кнопку [Подтвердить].

Записи об образцах отобразятся в рабочей области раздела «Загрузка файлов» со статусом «Планирование запуска».

Список образцов для загрузки результатов

В списке образцов для загрузки результатов секвенирования отображаются записи, созданные процедурой Экспресс-трекинга.

Для каждой записи отображаются параметры из таблицы 7.

Таблица 7 – Список параметров для записи образца на этапе «Загрузка фалов»

Параметр	Описание
Образец	Код образца
Запуск	Название запуска образца
Дата изменения	Дата последнего изменения записи об образце
Статус	Отображение статуса образца – «Планирование запуска»

Просмотр и редактирование сведений об образцах

Для просмотра сведений об образце нажмите кнопку [Подробнее] , расположенную в строке с нужным образцом. В браузере отобразится страница, содержащая данные:

1. Данные образца («Код образца)».
2. Данные о запуске («Название»).

Для редактирования кода образца [Редактировать] на панели инструментов. Поля станут доступны для редактирования. Внесите необходимые изменения и нажмите кнопку [Сохранить].

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

Загрузка файлов с результатами секвенирования

Для загрузки файлов с результатами секвенирования:

1. Отметьте записи образцов, для которых будет осуществляться загрузка.
2. Нажмите кнопку на панели инструментов. На экране отобразится окно выбора файлов для загрузки.

Для каждого образца загружаются:

1. Файлы, полученные в результате предварительной обработки данных с секвенатора в формате *.bam.txt.
2. Данные метрик качества в формате *.txt.

В поле «Необходимые файлы» окна «Загрузка файлов» представлен список файлов, которые требуется загрузить в программу

Предварительная может выполняться на отдельных вычислительных серверах. Блок-схема предварительной обработки данных приведена в Приложении Б.

3. Нажмите на поле «Выберите файлы». На экране отобразится стандартное окно ОС для поиска и выбора файлов для загрузки.
4. Выберите необходимые файлы и нажмите кнопку [Продолжить].

На экране отобразится процесс загрузки файлов. После завершения загрузки файлов автоматически начнется анализ представленных в них данных и образцы переместятся в раздел [В обработке].

3.3 ОБРАБОТКА ФАЙЛОВ С РЕЗУЛЬТАТАМИ СЕКВЕНИРОВАНИЯ

Образцы, находящиеся на этапе обработки, отображаются в разделе «В обработке». Обработка загруженных файлов начинается автоматически после выполнения загрузки файлов данных (см. раздел 3.2 подраздел «Загрузка файлов с результатами секвенирования» п.4). После завершения обработки образцы автоматически переносятся в раздел «Аннотация».

3.4 АННОТИРОВАНИЕ

Раздел «Аннотация» исследования «АнеуПГТ» содержит следующие структурные элементы:

- блок фильтров;
- панель инструментов (таблица 8);

Некоторые кнопки отображаются на панели инструментов, если в списке образцов выбрана хотя бы одна запись.

- таблица со списком образцов для аннотирования;
- панель инструментов в строке каждого образца (таблица 9).

Таблица 8 – Кнопки на панели инструментов раздела «Аннотация» и их назначение

Наименование	Изображение	Описание
Показать графики		Просмотр графиков расчета копий хромосом исследуемых образцов
Дополнительно		Кнопка для просмотра дополнительных опций

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

Наименование	Изображение	Описание
Пометить как «Срочный образец»		В строке с записью об образце отобразится иконка Для удаления пометки повторно нажмите на кнопку
Перерасчет		Запуск процедуры перерасчета данных
Забраковать		Забраковывание образца, не прошедшего контроль качества (см. Забраковывание)
Отправить в архив		Перемещение выбранного образца в архив (Архивирование данных)

Таблица 9 – Кнопки на панели инструментов в строке каждого образца и их назначение

Наименование	Изображение	Описание
Просмотр результатов		Переход на страницу с результатами выбранного образца
Дополнительно		Кнопка для просмотра дополнительных опций
Перерасчет		Запуск процедуры перерасчета данных
Подробнее		Открыть форму для просмотра и редактирования сведений об образце
Новое событие		Добавить запись о событии в историю образца
Новое событие		Открывает окно со списком событий в истории образца

Список образцов для аннотации

В списке образцов для аннотации отображаются записи, прошедшие обработку.

Для каждой записи отображаются параметры из таблицы 10.

Таблица 10 – Список параметров для записи образца на этапе «Аннотация»

Параметр	Описание
Образец	Код образца
Назначен	Имя пользователя (врача), которому назначен образец для исследования
Запуск	Название запуска образца
Дата изменения	Дата последнего изменения записи об образце
Контроль качества	Панель для отображения иконок с параметрами контроля качества данных: – информация о генотипе – рассчитанное стандартное отклонение

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

Параметр	Описание
	– число прочтений (ридов) в файле данных секвенирования образца – рассчитанное значение MAPD – доля выровненных прочтений на геном человека При выходе значений из границ допустимых параметров контроля цвет иконок меняется с зеленого на красный, например: – наличие нарушений, анеуплоидия в генотипе образца.

Просмотр результатов по образцу

Для просмотра результатов по образцу нажмите кнопку [Просмотр результатов] в строке с записью об образце. В браузере отобразится страница просмотра результатов.

Данная страница содержит:

- название образца;
- раскрывающийся список проведенных расчетов для данного образца Название расчета – дата и время его проведения;
- панель инструментов (таблица 11);
- данные с результатами исследования (Генотип, Стандартное отклонение, Число прочтений, MAPD, Доля выровненных на геном человека прочтений);
- вкладка с результатами обработки «Результат».

Таблица 11 – Кнопки на панели инструментов страницы «Образец» и их назначение

Наименование	Изображение	Описание
Показать графики		Просмотр графиков в отдельном окне
Перерасчет		Перерасчет данных с возможностью загрузить новый файл данных и указать причину перерасчёта. После перерасчета на странице аннотации образца в списке выборов расчётов добавится новый расчёт со своими результатами
Редактировать		Изменение данных образца
Сформировать результат		Сформировать результат исследования и перевести образец на этап «Врачебное заключение»

Вкладка «Результат» содержит:

1. Генотип, сформированный автоматически на основании данных, полученных при обработке данных.
2. График расчета количества копий хромосом для всех хромосом (рисунок 1). На графике представлены все хромосомы с разделением на полосы бэндов (бэнд, бенд, цитобенд – рисунок полос, который формируют хромосомы в метафазе при проведении цитогенетического исследования).

   Справа от графика расположен элемент управления, позволяющий включать и выключать отображение данных на графике:

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

Покрытие – точки с данными покрытия образца;

Фильтр Савицкого-Голея – график значений после фильтрации алгоритмом Савицкого-Голея;

CBS – график значений, полученных методом CBS (Circular Binary Segmentation – Цикличная бинарная сегментация).

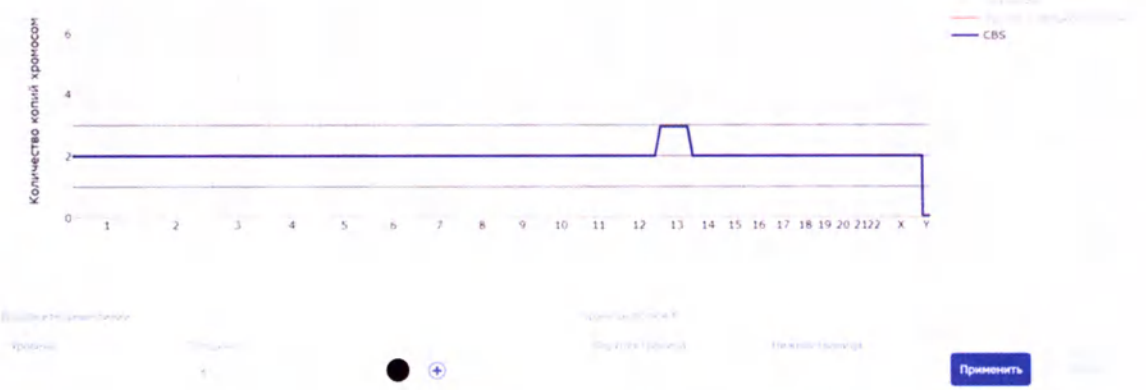

Рисунок 1 – График расчета количества копий хромосом

3. График расчета количества копий хромосом для отдельной хромосомы (рисунок 2). Для отображения графика выбранной хромосомы в верхней части расположена строка с интерактивными указателями с номерами хромосом, а также символами X и Y для половых хромосом. На графике отражаются точки значений (•) покрытия образца, соответствующие отдельным бинам (бин – фрагмент хромосомы фиксированной длины). При наведении указателем мыши на точку с данными отображается информация о координатах этого бина (X: 78566500), к какому бэнду он принадлежит (Бэнд: q22.3) и значение покрытия, рассчитанное для этого бина Y: 3.118782693523352 .

Для удобства пользователя реализована возможность размещать на графике дополнительные горизонтальные линии. Для этого под графиком расположено окно ввода данных об уровне, толщине и цвете линии, а также кнопка [Добавить].

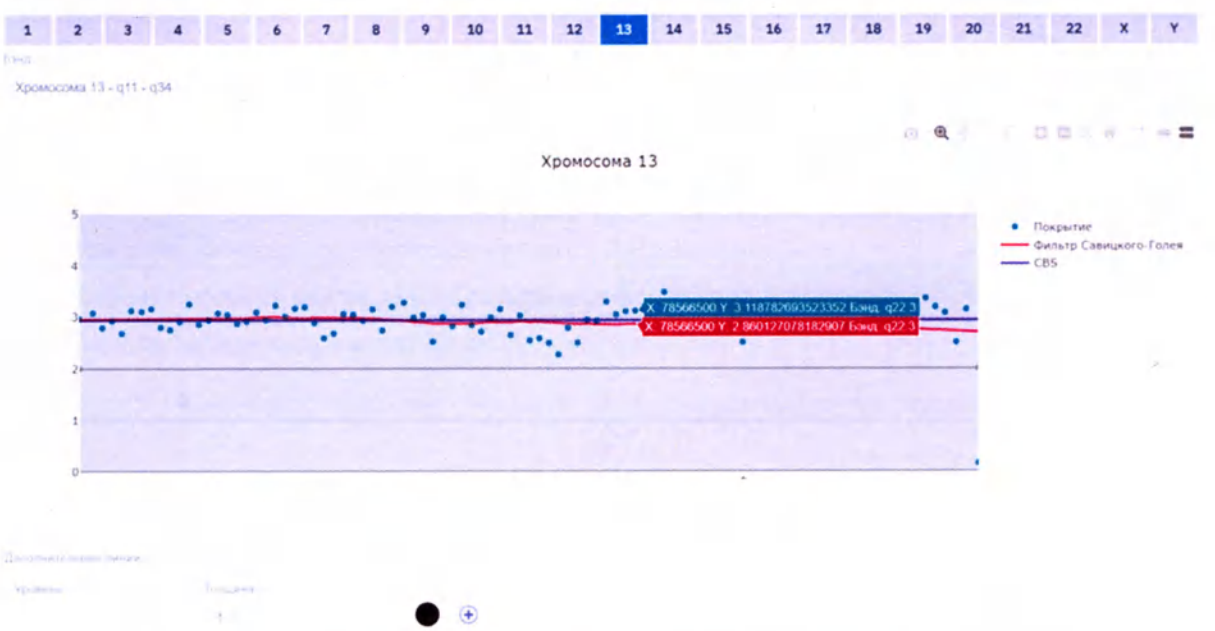

Рисунок 2 – График расчета количества копий хромосом для отдельной хромосомы

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

Просмотр графиков расчета числа копий хромосом

Для просмотра графиков отметьте флагом выбора один или несколько образцов в общем списке и нажмите появившуюся на панели инструментов кнопку [Показать графики] . В браузере отобразится окно «Графики аннотации» (рисунок 3).

Рисунок 3 – Окно «Графики аннотации»

На экране представлены графики копийности для каждого выбранного образца. В правой части окна – таблица результатов для выбранных образцов.

3.5 ВРАЧЕБНОЕ ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Раздел «Врачебное заключение» содержит:

1. Панель инструментов (таблица 12). Некоторые кнопки отображаются на панели инструментов, если в списке образцов выбрана хотя бы одна запись.
2. Рабочая область со списком образцов для формирования врачебного заключения.
3. Панель инструментов в строке каждого образца (таблица 13).

Таблица 12 – Кнопки на панели инструментов раздела «Врачебное заключение» и их назначение

Наименование	Изображение	Описание
Показать графики		Просмотр графиков покрытия исследуемых образцов
Дополнительно		Кнопка для просмотра дополнительных опций

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

Таблица 13 – Кнопки на панели инструментов в строке каждого образца и их назначение

Наименование	Изображение	Описание
Просмотр результатов		Переход на страницу аннотации выбранного образца
Пользователи		Выбор пользователя для отображения в отчете
Дополнительно		Кнопка для просмотра дополнительных опций
Пометить как «Срочный образец»		В строке с записью об образце отобразится иконка . Для удаления пометки повторно нажмите на кнопку
Вернуть на аннотацию		Перемещение записи об образце в раздел «Аннотация»
Забраковать		Забраковывание образца, не прошедшего контроль качества (см. Забраковывание)
Отправить в архив		Перемещение выбранного образца в архив (Архивирование данных)

Формирование врачебного заключения

Для формирования врачебного заключения:

1. Нажмите кнопку [Просмотр результатов] в строке с записью об образце. В браузере отобразится страница просмотра результатов по образцу.
2. Нажмите кнопку [Сформировать результат] на панели инструментов. Отобразится окно ввода врачебного заключения по образцу. При этом в верхней части окна отображается ранее введенное лабораторное заключение.
3. При необходимости скорректируйте текст заключения.
4. Нажмите кнопку [Сохранить результат].

После сохранения запись об образце будет автоматически перемещена в раздел «Результаты».

3.6 РЕЗУЛЬТАТЫ

Раздел «Результаты» содержит список образцов, для которых завершено формирование врачебного заключения.

Просмотр результатов по образцу и список операций, доступных в данном разделе, по большей части соответствует разделу «Врачебное заключение».

Дополнительно в разделе «Результаты» реализовано сохранение результатов исследований в файл в формате *.docx.

Чтобы **скачать результат исследования**, нажмите кнопку [Скачать результат] в строке с нужным образцом. Отчет в формате *.docx будет сохранен на ПК согласно текущим настройкам браузера.

При необходимости записать в **один файл** заключения по нескольким образцам:

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

1. Выделите нужные образцы и нажмите кнопку [Скачать результат] на панели инструментов. На экране отобразится окно выбора шаблона отчета.
2. С помощью раскрывающегося списка выберите нужный отчет.
3. Нажмите кнопку [Скачать результаты].

Отчет в формате *.docx будет сохранен на ПК согласно текущим настройкам браузера.

3.7 ФИЛЬТРАЦИЯ ДАННЫХ

Фильтрация данных доступна в каждом разделе приложения и позволяет найти записи, удовлетворяющие условиям фильтра (например, код образца). Для настройки фильтра перейдите в нужный раздел приложения и разверните блок с параметрами фильтрации, нажав на › Фильтры в верхней части страницы.

Укажите параметры фильтрации и нажмите кнопку [Применить]. Данные в разделе будут отфильтрованы согласно введенному параметру и отобразятся подсказки указывающие, что к списку применен фильтр.

Чтобы сбросить фильтр, нажмите кнопку [Сброс].

3.8 ЗАБРАКОВЫВАНИЕ

Если контроль качества определил у образца глубину и\или ширину прочтения ниже нормы, целесообразно отметить такой образец, как забракованный.

Для забраковывания образца:

1. Выделите запись об образце (одном или нескольких) и нажмите кнопку на панели инструментов. В браузере отобразится окно «Забраковать образцы».
2. В окне проверьте список образцов и введите причину забраковывания, если необходимо.
3. Нажмите кнопку [Подтвердить].

В строке с записью об образце отобразится иконка , при наведении на которую отобразится всплывающая подсказка с причиной забраковывания.

> Отменить забраковывание невозможно.

3.9 ИСТОРИЯ

Для каждого созданного в программе образца ведется журнал, в который автоматически записывается история операций, выполненных с данным образцом, а именно следующие параметры:

- этапы, пройденные образцом;
- дату и время проведения этапа;
- учетную запись пользователя, работавшего с данным образцом на каждом из этапов.

Просмотр истории событий

Для просмотра истории нажмите кнопку в строке с записью об образце.

Справа отобразится история событий для выбранного образца.

Чтобы закрыть журнал, нажмите кнопку .

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

Создание события по образцу

Для ручного добавления записи (события) в журнал :

1. Нажмите кнопку в строке с записью об образце. На экране отобразится окно создания события.
2. Введите сообщение, которое будет отображено в журнале событий.
3. Выберите цвет, которым будет отмечена запись.
4. Нажмите кнопку [Создать событие].

Запись отобразится в истории для выбранного образца.

3.10 АРХИВИРОВАНИЕ ДАННЫХ

В программе реализована возможность архивирования записей, утративших актуальность.

Перемещение в архив

Для перемещения записи об образце в архив перейдите в раздел, где расположена данная запись, выделите ее в общем списке (установите флаг выбора в начале нужной строки) и нажмите кнопку [Отправить в архив] .

Далее подтвердите свой выбор, нажав кнопку [Подтвердить] в окне, отобразившемся в браузере.

Запись будет скрыта из общего списка.

Просмотр архивных записей

Для просмотра записей, перенесенных в архив, активируйте параметр «Показывать архивные записи» в настройках фильтра (см. п. 3.7).

Перемещение из архива

Для переноса записи из архива включите в параметрах фильтрации просмотр архивных данных, выделите нужную запись в общем списке (установите флаг выбора в начале нужной строки) и нажмите . Далее нажмите кнопку [Подтвердить] в окне, отобразившемся на экране. У записи будет снят статус «архивная».

4 НАСТРОЙКА ПРОГРАММЫ

Работа с настройками программы осуществляется через меню «Настройки», отображающееся в правой части окна после нажатия на кнопку .

4.1 ШАБЛОНЫ ОТЧЕТОВ

При формировании заключения с результатами исследования используется шаблон, данные в который подставляются автоматически согласно тем данным, что пользователь вводил на разных этапах исследования. При этом программа позволяет редактировать шаблон, добавляя или исключая из него определенные параметры.

Настройка шаблона отчета с результатами исследования осуществляется на странице «Настраиваемые отчеты» (Настройки - Шаблоны отчетов).

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

Данная страница содержит перечень доступных шаблонов и переменных, которые могут быть включены в шаблоны.

Для редактирования шаблона:

1. Сохраните шаблон на компьютер - нажмите кнопку в строке с нужным шаблоном. Файл с шаблоном будет сохранен согласно заданным настройкам браузера
2. Внесите необходимые изменения с помощью текстового редактора (используйте опцию копирования переменной, доступную по кнопке).
3. Сохраните данные.
4. Загрузите шаблон в программу, нажав кнопку .

Для удаления шаблона нажмите кнопку в строке с нужным отчетом.

4.2 О ПРОГРАММЕ

Просмотр информации о текущей версии программы, а также информация о компании-производителе осуществляется в разделе «О программе» меню «Настройки».

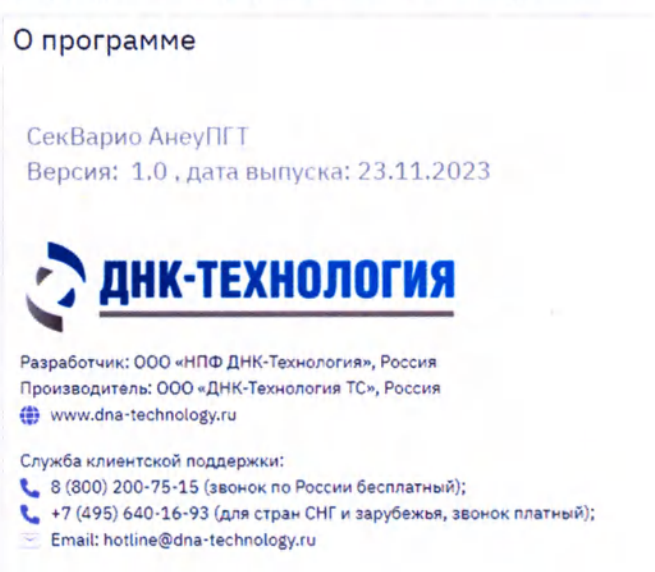

Рисунок 4 – Информация о программе

Для проверки наличия обновления нажмите кнопку [Проверить наличие обновлений], расположенную в правом верхнем углу страницы. Дату загрузки обновления и версию можно посмотреть, нажав кнопку [Описание обновления].

5 ДЕИНСТАЛЛЯЦИЯ

Для деинсталляции серверной части ПО требуется квалификация системного администратора. Процедура деинсталляции ПО «СекВарио АнеуПГТ» выполняется сотрудниками компании разработчика либо квалифицированным специалистом, прошедшим обучение в компании разработчика.

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

6 АДРЕС ДЛЯ ОБРАЩЕНИЯ

Производитель: Общество с ограниченной ответственностью «ДНК-Технология ТС», Россия.

Адрес производителя: ООО «ДНК-Технология ТС», Россия, 117246, г. Москва, Научный проезд, д. 20, стр. 4.

Место производства: ООО «ДНК-Технология ТС», Россия, 117246, г. Москва, Научный проезд, д. 20, стр.4.

Разработчик: Общество с ограниченной ответственностью «НПФ ДНК-Технология», Россия.

Адрес разработчика: Россия, 109388, г. Москва, ул. Гурьянова, д. 83 стр. 1

Служба клиентской поддержки:

8 (800) 200-75-15 (звонок по России бесплатный);

+7 (495) 640-16-93 (для стран СНГ и зарубежья, звонок платный);

Email: hotline@dna-technology.ru

По телефону можно обращаться по будням с 9:00 до 18:00 по московскому времени.

Время ожидания ответа от специалиста поддержки по электронной почте: по будням – в течение рабочего дня, в выходной – до трех дней.

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

ПРИЛОЖЕНИЕ А

Перечень национальных стандартов, применяемых к ПО «СекВарио АнеуПГТ», включает:

1. ГОСТ Р ИСО/МЭК 12119-2000 Информационная технология. Пакеты программ. Требования к качеству и тестирование;
2. ГОСТ Р ИСО/МЭК 9126-93 Информационная технология. Оценка программной продукции. Характеристики качества и руководства по их применению;
3. ГОСТ Р ИСО 9127-94 Системы обработки информации. Документация пользователя и информация на упаковке для потребительских программных пакетов;
4. ГОСТ 28195-89 Оценка качества программных средств. Общие положения;
5. ГОСТ Р ИСО/МЭК ТО 9294-93 Информационная технология. Руководство по управлению документированием программного обеспечения;
6. ГОСТ Р 51188-98 Защита информации. Испытания программных средств на наличие компьютерных вирусов. Типовое руководство;
7. ГОСТ IEC 62304-2022 Изделия медицинские. Программное обеспечение. Процессы жизненного цикла.

Примечание – Указанные выше стандарты действительны на момент утверждения Руководства пользователя.

ПРИЛОЖЕНИЕ Б

Схема интеграции оборудования и схема этапов исследования с использованием ПО «СекВарио АнеуПГТ» представлены на рисунках Б.1, Б.2, Б.3.

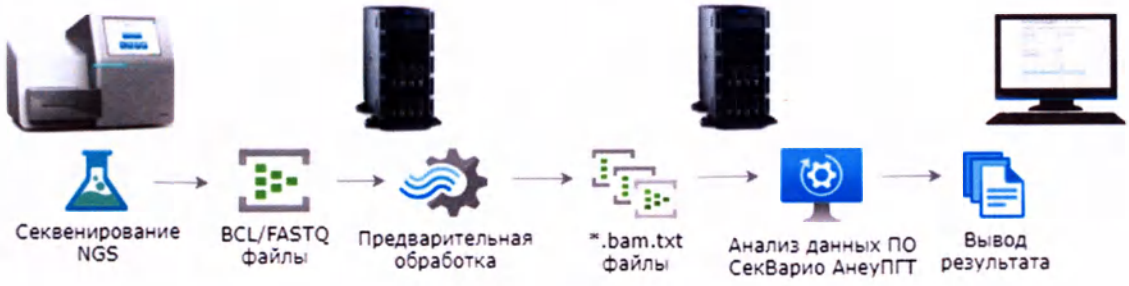

Рисунок Б.1 – Схема интеграции оборудования

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

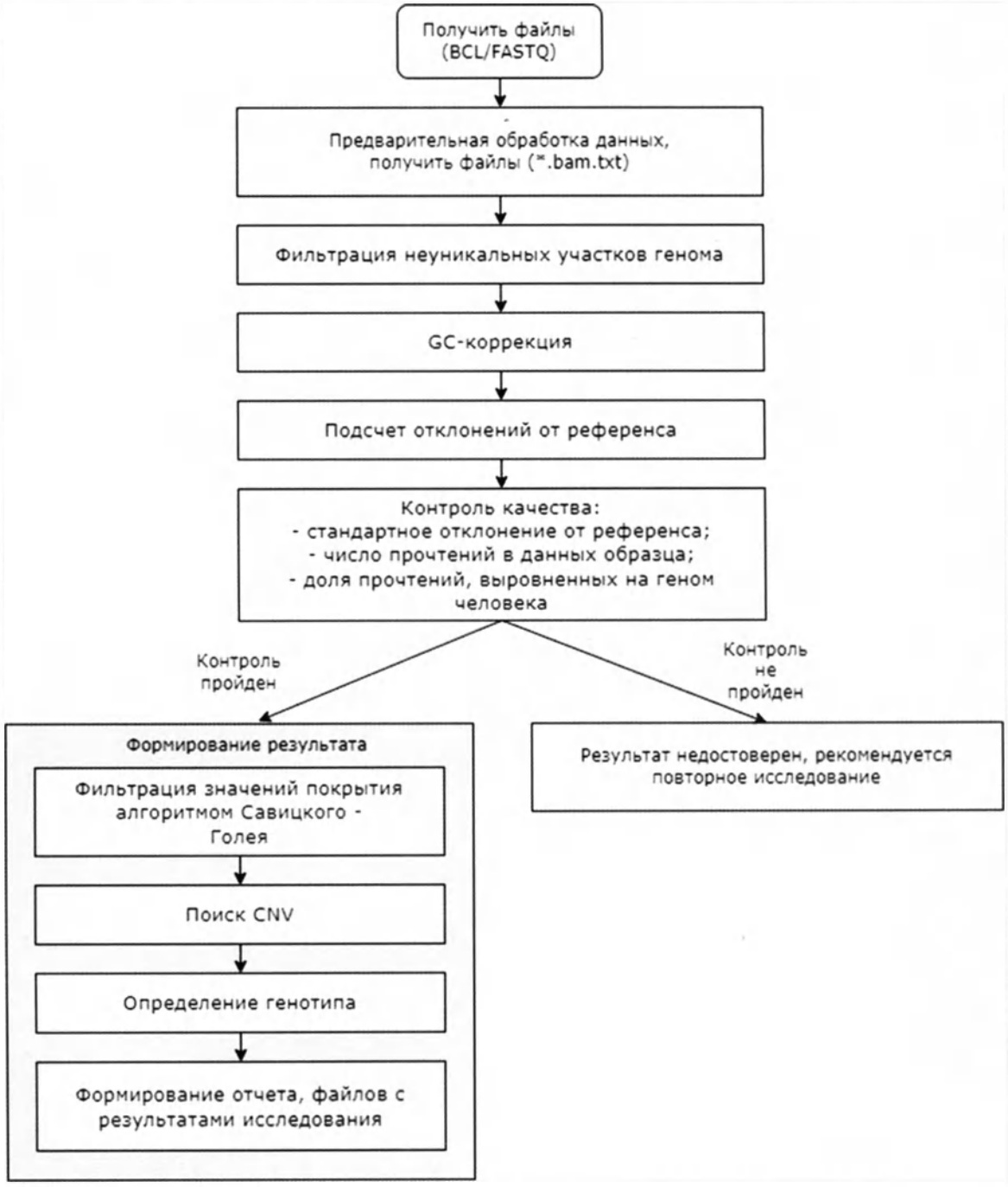

Рисунок Б.2 – Схема этапов исследования

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

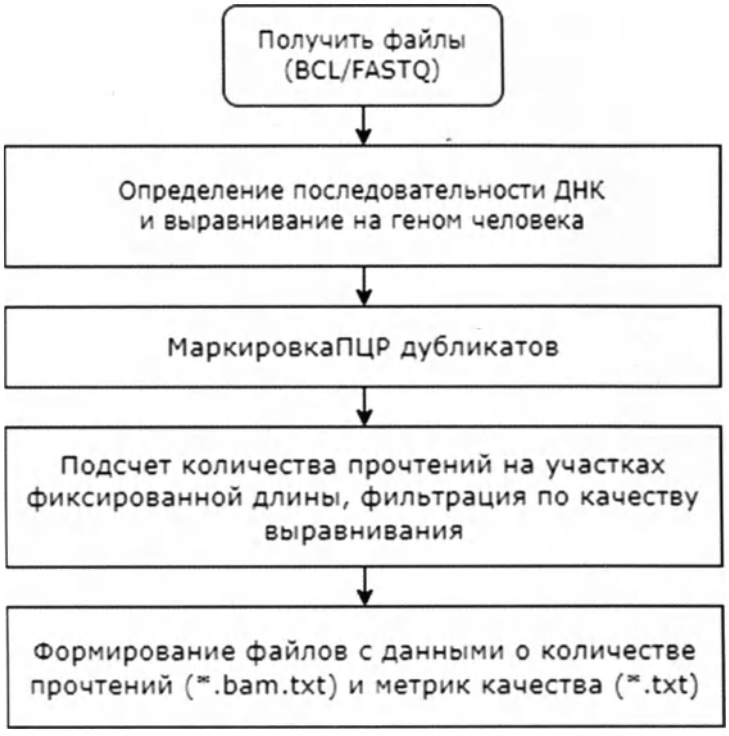

Рисунок Б.3 – Схема предварительной обработки данных

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

Прошито, пронумеровано и
скреплено печатью 20
(двадцать) листа (ов)
специалист по регистрации
Щербакова Н.И.

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

ООО «ДНК-Технология ТС»

Паспорт качества

Набор реагентов для выявления хромосомных аномалий в единичных клетках методом высокопроизводительного секвенирования NGS на платформе Illumina (АнеуПГТ)

Лабораторный контрольный образец для набора реагентов АнеуПГТ

Серия: К2311
Дата изготовления: 2023-11-23
Срок годности до: 2024-11-23
Условия хранения и транспортирования: от 2 °С до 8 °С

Результат контроля ОТК

Наименование ЛКО	Требование	Результат	Соответствие
	Концентрация ДНК, нг/мкл		
ЛКО	0,002 ± 0,0005	0,0021	Соответствует

Заключение: соответствует требованиям производственного регламента № 95
Дата выдачи паспорта: 2023-11-24
Начальник ОТК: Скоркина Ю.А.
Штамп ОТК

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU